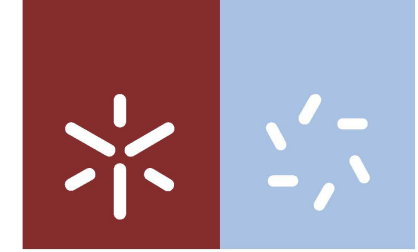


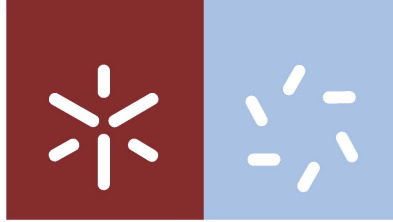


**Nova geração de sistemas microfluídicos  
baseada em materiais poliméricos inteligentes**

Eduardo José de Sousa Pimentel

**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências





**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Eduardo José de Sousa Pimentel

**Nova geração de sistemas microfluídicos  
baseada em materiais poliméricos inteligentes**

Dissertação de Mestrado  
Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas

Trabalho realizado sob orientação do  
**Professor Doutor Filipe Vaz**  
e da  
**Doutora Vanessa Cardoso**

## DECLARAÇÃO

**Nome:** Eduardo José de Sousa Pimentel

**Endereço eletrónico:** pg31413@alunos.uminho.pt; **Telefone:** 911152599

**Cartão de Cidadão:** 14588377

**Título da dissertação:** Nova geração de sistemas microfluídicos baseada em materiais poliméricos inteligentes.

### **Orientadores:**

Professor Doutor Filipe Vaz

Doutora Vanessa Fernandes Cardoso

**Ano de conclusão:** 2018

**Mestrado:** Biofísica e Bionanossistemas

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Universidade do Minho, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura





## Agradecimentos

A realização desta dissertação resultou de um extenso trabalho, horas de estudo e reflexão que contribuíram para a concretização do objetivo a que me propus. Contudo, para a execução deste projeto precisei do acompanhamento, ajuda e apoio de pessoas a nível pessoal e profissional.

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus orientadores, Professor Doutor Filipe Vaz e à Doutora Vanessa Cardos por aceitarem a orientação deste projeto. Agradeço também o seu extenso e vasto conhecimento científico, bem como a sua inteira dedicação, disponibilidade, simpatia e acolhimento que demonstraram.

Um agradecimento especial ao Professor Doutor Senentxu Lanceros-Mendez, pois, embora não sendo oficialmente orientador, durante todo o ano letivo teve um papel preponderante para o bom desenvolvimento deste trabalho. Agradeço o conhecimento científico e experiência que partilhou comigo, os conselhos que me deu e todo o apoio e dedicação prestados.

Agradeço ao *BCMaterials* (em Bilbao, Espanha) e em especial ao Doutor Alberto Macieiras pelo acolhimento no período de Erasmus e toda a preciosa ajuda.

Agradeço também a todos os membros do grupo de investigação *Electroactive Smart Materials* (ESM), por toda a ajuda e amizade que me prestaram ao longo deste ano. Considero-me uma pessoa com muita sorte por poder fazer parte desta família.

Um enorme agradecimento ao Ricardo, ao Luís, ao Ander e ao André por todo o incentivo, apoio e carinho, que me ajudaram a conseguir terminar esta etapa com ânimo e otimismo.

Um especial agradecimento a todos os meus amigos, que estiveram presentes em todos os momentos ao longo deste tempo, ultrapassando comigo obstáculos e congratulações por que passei.

Por último, mas não menos importante, um forte agradecimento aos meus pais e avós, sem vocês nada disto seria possível.



## Resumo

A microfluídica tornou-se uma área de elevado interesse em inúmeras aplicações (bio)tecnológicas por permitir desenvolver dispositivos portáteis de dimensões muito reduzidas com a capacidade de executar diversas funções em paralelo e com tempos de resposta rápidos. Diversos materiais têm vindo a ser aplicados nesta área, incluindo materiais inorgânicos como o silício e o vidro, e materiais de origem polimérica como os elastómeros e o papel. Este último tem sido particularmente estudado nos últimos anos e aplicado em diversas áreas devido a sua fácil acessibilidade, capacidade de gerar fluxos passivamente por capilaridade e o facto de ser um material biodegradável. Apesar das inúmeras vantagens, o papel desempenha meramente uma ação de suporte no sistema, sem qualquer ação sobre os fluidos neles contidos.

O presente trabalho propõe a introdução de materiais inteligentes e eletroativas, na área da microfluídica, de forma a aumentar a limitada gama de substratos de papel comercialmente disponíveis. Foram processados polímeros com diferentes morfologias: fibras de poli(L-ácido láctico) (PLLA) com diferentes orientações, filmes porosos de PLLA, e filmes porosos de poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF) e seus copolímeros. Dada a natureza hidrofóbica, nanopartículas hidrofílicas (zeólitos do tipo NaY) foram introduzidos na matriz polimérica e pós-tratamentos de plasma com árgon (Ar) e oxigénio ( $O_2$ ) foram efetuados na tentativa de colmatar esta limitação e permitir assim que estes possam ser aplicados, como alternativos ao papel, no fabrico de sistemas microfluídicos. As técnicas de eletrofiação e separação de fase induzida por temperatura foram utilizadas para o fabrico de fibras e filmes porosos, respetivamente. Após processamento, as amostras foram caracterizadas em termos morfológicos e físico-químicos. Além disso, ensaios de capilaridade foram executados. Os resultados demonstraram que a adição de NaY não promove alteração na hidrofobicidade, contrariamente aos tratamentos com plasma com Ar e  $O_2$ , que permitiram em alguns casos tornar os materiais superhidrofílicos e assim adequados para microfluídica. Os materiais processados sem presença de zeólitos e submetidos a tratamento com plasma de  $O_2$  foram aqueles que apresentaram fluxos por capilaridade mais elevados e comprovaram ser adequados para impressão a cera de barreiras hidrofóbicas, similar aos dispositivos de papel disponíveis, demonstrando assim o seu potencial para microfluídica.



## Abstract

Microfluidic has become an area of large interest due to its intrinsic advantages. This technology allows to develop devices with small dimensions and with the ability to execute several functions at the same time with fast response times. Different materials are being used for microfluidic applications, including inorganic materials such as silicon and glass, and organic materials like elastomers and paper. Paper has been particularly studied in recent years and applied in several areas due to its easy accessibility, its ability to generate flow through capillary effect and the fact of being biodegradable. However, paper is just being used as a support role in the system, without any action on the fluids contained therein.

The present work proposes the introduction of smart materials, with electroactive properties, in the microfluidic area, in order to increase the limited range of commercially available paper substrates. Several polymers were processed with different morphologies: oriented and randomly oriented poly(L-lactic acid) (PLLA) fibers, porous films of PLLA and porous of films of (poly(vinylidene fluoride) (PVDF) and its copolymers. Given the hydrophobic nature of the materials, hydrophilic nanoparticles (NaY zeolites) were incorporated to the polymer matrix and argon (Ar) and oxygen (O<sub>2</sub>) plasma post-treatments were performed in an attempt to overcome this limitation and thus enable the developed ones to appear, as an alternative to paper, in the manufacture of microfluidic systems. Electrospinning and temperature-induced phase separation were used to produce fibers and porous films, respectively. After processing, the samples were characterized in terms of morphology and physicochemical properties. In addition, capillary tests and proof of concepts were carried out. The results showed that the addition of NaY does not promote any variation in the hydrophobicity, contrary to the Ar and O<sub>2</sub> plasma treatments, which allowed in some cases to make the materials superhydrophilic and thus suitable for microfluidic. The materials processed without zeolites and submitted to O<sub>2</sub> plasma treatment showed higher capillarity flows and proved to be suitable for wax printing of hydrophobic barriers, like commercially available paper devices, thus demonstrating their potential for microfluidic.



# Índice

1. Introdução.....	2
1.1. Contextualização .....	3
1.2. Motivação e objetivos do trabalho .....	4
1.3. Estrutura da dissertação .....	5
2. Enquadramento teórico .....	7
2.1. Microfluídica.....	9
2.1.1. Introdução.....	9
2.1.2. Características gerais.....	10
2.2. Materiais convencionais e técnicas de fabrico .....	11
2.2.1. Silício e Vidro.....	11
2.2.2. Polímeros.....	12
2.2.3. Papel .....	15
2.3. Materiais poliméricos inteligentes .....	17
2.3.1. Poli (L-ácido láctico).....	18
2.3.2. Poli(fluoreto de vinilideno) .....	19
2.4. Estado da arte.....	22
3. Materiais e métodos .....	30
3.1. Introdução.....	31
3.2. Materiais.....	31
3.3. Processamento de substratos de poli(L-ácido láctico) constituídos por fibras.....	31
3.3.1. Fibras de poli(L-ácido láctico) não orientadas .....	33
3.3.2. Fibras de poli(L-ácido láctico) orientadas .....	34
3.4. Processamento de filmes de poli(L-ácido láctico) com estrutura porosa .....	35
3.5. Processamento de substratos baseados em poli(fluoreto de vinilideno) com estrutura porosa	36
3.6. Tratamento de plasma .....	37

3.7. Resumo dos substratos baseados em poli(L-ácido láctico) e poli(fluoreto de vinilideno) processados .....	39
3.8. Técnicas de caracterização.....	39
3.8.1. Microscopia eletrônica de varrimento .....	39
3.8.2. Ângulo de contacto .....	40
3.8.3. Espectroscopia de infravermelhos com transformadas de Fourier .....	42
3.8.4. Calorimetria diferencial de varrimento .....	42
3.8.5. Ensaios de capilaridade .....	43
3.8.6. Prova de conceito .....	44
4. Resultados e discussão .....	48
4.1. Introdução.....	49
4.2. Substratos comerciais .....	49
4.3. Substratos de poli(L-ácido láctico).....	50
4.3.1. Fibras de poli(L-ácido láctico) não orientadas .....	50
4.3.1.1. Análise estrutural e morfológica .....	50
4.3.1.2. Análise da hidrofobicidade de superfície .....	53
4.3.1.3. Análise das propriedades físico-químicas.....	54
4.3.1.4. Estudos de capilaridade .....	55
4.3.2. Fibras de poli(L-ácido láctico) orientadas .....	57
4.3.2.1. Análise estrutural e morfológica .....	57
4.3.2.2. Análise da hidrofobicidade de superfície .....	59
4.3.2.3. Análise das propriedades físico-químicas.....	60
4.3.2.4. Estudos de capilaridade .....	60
4.4. Filmes porosos de poli(L-ácido láctico) .....	61
4.4.1. Análise estrutural e morfológica .....	61
4.4.2. Análise da hidrofobicidade de superfície .....	62
4.4.3. Análise das propriedades físico-químicas.....	63
4.4.4. Estudo de capilaridade .....	64
4.5. Filmes porosos baseados no poli(fluoreto de vinilideno).....	65
4.5.1. Análise morfológica e estrutural .....	66



4.5.2. Análise da hidrofobicidade de superfície .....	67
4.5.3. Análise das propriedades físico-químicas .....	69
4.5.4. Estudos de capilaridade .....	70
4.6. Estudo comparativo .....	72
4.7. Prova de conceito .....	73
5. Conclusões e perspectivas futuras .....	77
5.1. Conclusões .....	79
5.2. Perspectivas futuras .....	81
Referências bibliográficas .....	83



## Índice de Figuras

Figura 2.1: Fotografia ilustrativa das reduzidas dimensões de um sistema microfluídico. Adaptado de [11].	9
Figura 2.2: Método de fabricação de microcanais em PDMS por litografia suave (fotolitografia de SU-8, seguido de moldagem por réplica do PDMS): a) fabrico do molde em SU-8 por fotolitografia utilizando um substrato de silício b) PDMS no estado líquido é vestido sobre o molde e curado a uma temperatura entre os 40 e a 100°C até total endurecimento c) remoção da estrutura em PDMS d) selagem da estrutura em PDMS. Adaptado de [26].	13
Figura 2.3: Método de impressão a cera em papel: a) desenho dos microcanais num programa DAC; b) impressão através de uma impressora própria para o efeito; c) aquecimento da cera para penetrar o papel. Adaptado de [40].	16
Figura 2.4: Representação esquemática da formação dos microcanais, quando a cera hidrofóbica aquece e atravessa toda a espessura do substrato de papel. Adaptado de [41].	16
Figura 2.5: Comportamento de um material piezoelétrico: efeito piezoelétrico direto e efeito piezoelétrico inverso. Adaptado de [50].	18
Figura 2.6: Representação da estrutura química do PLLA.	18
Figura 2.7: Estrutura química das duas principais fases do PVDF: a) Fase $\alpha$ ; b) Fase $\beta$ . Adaptado de [56].	20
Figura 2.8: Estrutura química do P(VDF-TrFE).	21
Figura 2.9: Estrutura química do: a) P(VDF-CTFE) e b) P(VDF-HFP).	21
Figura 2.10: Sistema microfluídico capaz de mimetizar um pulmão: a) método de funcionamento do <i>lung-on-a-chip</i> ; b) perspetiva da dimensão do sistema. Adaptado de [66].	24
Figura 2.11: Sistema microfluídico para quantificação de glucose no sangue: a) método de funcionamento do sistema b) fotografia do sistema em papel. Adaptado de [64].	25
Figura 2.12: Dispositivo utilizado para a deteção de <i>e.coli</i> na água através de uma aplicação num telemóvel. Adaptado de [67].	26
Figura 3.13: Dispositivo capaz de identificar possíveis ataques químicos e patogénicos: a) deteção de gases que afetam o sistema nervoso; b) deteção de toxinas que possam potenciar uma doença infecciosa; c) identificação de agentes patogénicos. Adaptado de [71].	27
Figura 3.1: Equipamento utilizado para o desenvolvimento da técnica de eletrofiação destacando-se a) fonte de elétrica; b) Bomba de fluxo; c) coletor estático.	32

Figura 3.2: Representação esquemática da produção de fibras de PLLA não orientadas a) pesagem do polímero b) adição dos solventes, c) dissolução do polímero sobre agitação magnética d) processo de eletrofiação. No caso da adição de zeólitos, os mesmos foram previamente dispersos nos solventes antes da adição do PLLA. ....	34
Figura 3.3: Coletores utilizados na técnica de eletrofiação: a) coletor estático; b) coletor rotativo. ....	35
Figura 3.4: Representação esquemática da produção de filmes porosos de PLLA sem zeólitos: a) pesagem do PLLA; b) adição dos solventes; c) dissolução do PLLA por agitação magnética; d) deposição da solução com recurso a um extensor e evaporação a temperatura ambiente. No caso da adição de zeólitos, os mesmos foram previamente dispersos nos solventes antes da adição do PLLA. ....	36
Figura 3.5: Fotografia da câmara de tratamento de plasma. ....	38
Figura 3.6: Representação esquemática dos diferentes graus de interação de uma gota com uma superfície, caracterizada pelo ângulo de contacto. Adaptada de [96]. ....	41
Figura 3.7: Equipamento utilizado para medição do ângulo de contacto. ....	41
Figura 3.8: Termograma com as diferentes transições de temperatura. Adaptada de [98]. ....	43
Figura 3.9: Fotografia de um ensaio de capilaridade em que amostras de substratos recortadas são imergidas num corante alimentar: a) antes da imersão; b) após imersão onde ocorre fluxo do corante. ....	44
Figura 3.10: Fotografias do procedimento experimental para testar os substratos desenvolvidos para microfluídica: a) impressora a cera; b) aquecimento dos canais impressos; c) canais impressos; d) ensaios de capilaridade. ....	45
Figura 4.1: Imagens SEM de substratos comerciais: a) <i>Whatman no.1</i> ; b) <i>HF075</i> da <i>Millipore</i> (High Flow Plus); c) <i>HF180</i> da <i>Millipore</i> . (High Flow Plus) (escala não fornecida na brochura) .	49
Figura 4.2: Imagens SEM representativas dos substratos de PLLA com fibras não orientadas com: a) 0 % NaY; b) 5 % NaY; c) 10 % NaY; d) 20 % NaY; e) 0 % NaY com tratamento de plasma com argon; f) 20 % NaY com tratamento de plasma com argon; g) 0 % NaY com tratamento de plasma com oxigénio; h) 20 % NaY com tratamento de plasma com oxigénio. ....	51
Figura 4.3: Distribuição de tamanho das fibras não orientadas com diferentes concentrações de zeólitos, sem e com tratamento com plasma de argon (Ar) e com plasma de oxigénio (O <sub>2</sub> ). ....	52

Figura 4.4: Ângulos de contacto das fibras de PLLA não orientadas com concentrações crescentes de zeólitos NaY (0%,5%,10% e 20%) sem e com tratamento de plasma de argon (Ar) e oxigénio (O <sub>2</sub> ). .....	53
Figura 4.5: a) espetros de FTIR-ATR e b) curvas de DSC das fibras não orientadas com diferentes concentrações de zeólitos NaY, sem e com tratamento de plasma de argon (Ar) e oxigénio (O <sub>2</sub> ). .....	54
Figura 4.6: Estudos de capilaridade das fibras de PLLA não orientadas com concentrações crescentes de zeólitos NaY (0%,5%,10% e 20%) sem e com tratamento de plasma de argon (Ar) e oxigénio (O <sub>2</sub> ). .....	56
Figura 4.7: Imagens SEM representativas dos substratos de PLLA com fibras orientadas com: a) 0 % NaY; b) 20 %NaY; c) 0 % NaY com tratamento de plasma com argon; d) 0 % NaY com tratamento de plasma com oxigénio; e) 20 % NaY com tratamento de plasma com argon; f) 20 % NaY com tratamento de plasma com oxigénio. ....	57
Figura 4.8: Distribuição de tamanho das fibras orientadas com 0 e 20 % de zeólitos, sem e com tratamento com plasma de argon (Ar) e com plasma de oxigénio (O <sub>2</sub> ). ....	58
Figura 4.9: Ângulos de contacto das fibras de PLLA orientadas com 0 e 20 % de zeólitos, sem e com tratamento com plasma de argon (Ar) e com plasma de oxigénio (O <sub>2</sub> ). .....	59
Figura 4.10: Estudos de capilaridade das fibras de PLLA orientadas com 0 e 20 % de zeólitos, sem e com tratamento com plasma de argon (Ar) e com plasma de oxigénio (O <sub>2</sub> ). .....	60
Figura 4.11: Imagens SEM representativas dos filmes porosos de PLLA com a) 0% de zeólitos e b) 10% de zeólitos. ....	62
Figura 4.12: Ângulos de contacto dos filmes porosos de PLLA com 0% e 10% de zeólitos sem e com tratamento de plasma de argon (Ar) e oxigénio (O <sub>2</sub> ). .....	63
Figura 4.13: Curvas de DSC dos filmes de PLLA porosos com 0 e 10 % de zeólitos sem tratamentos de plasma. ....	64
Figura 4.14: Ângulos de contacto dos filmes porosos de PLLA com 0% e 10% de zeólitos sem e com tratamento de plasma de argon (Ar) e oxigénio (O <sub>2</sub> ). .....	65
<b>Figura 4.15:</b> Imagens SEM representativas dos filmes porosos processados. a) superfície do PVDF em contacto com o vidro; b) superfície do PVDF em contacto com o ar; c) secção transversal do PVDF; d) superfície do P(VDF-TrFE) em contacto com o vidro; e) superfície do P(VDF-TrFE) em contacto com o ar; f) secção transversal do PVDF-TrFE; g) superfície do P(VDF-HFP) em contacto	

com o vidro; h) superfície do P(VDF-HFP) em contacto com o ar i) secção transversal do P(VDF-HFP); j) superfície do P(VDF-CTFE) em contacto com vidro; l) superfície do P(VDF-CTFE) em contacto com o ar; m) secção transversal do P(VDF-CTFE); n) superfície do P(VDF-CTFE) com 10% de zeólitos em contacto com o vidro; o) superfície do P(VDF-CTFE) com 10% de zeólitos em contacto com o ar; p) seção transversal do P(VDF-CTFE) com 10% de zeólitos. ....	66
Figura 4.16: Ângulo de contacto dos filmes porosos de PVDF, P(VDF-TrFE), P(VDF-HFP) e P(VDF-CTFE), sem e com tratamentos de plasma de árgon (Ar) e oxigénio (O <sub>2</sub> ). ....	68
Figura 4.17: Ângulo de contacto dos filmes de P(VDF-CTFE) com 0% e 10% de zeólitos, sem e com tratamentos de plasma de árgon (Ar) e oxigénio (O <sub>2</sub> ). ....	69
Figura 4.18: a) espectros de FTIR-ATR ; b) curvas de DSC dos filmes porosos de P(VDF-CTFE) sem e com tratamento de plasma de oxigénio. ....	70
Figura 4.19: Fluxos capilares dos filmes porosos de PVDF, P(VDF-TrFE), P(VDF-HFP) e P(VDF-CTFE), sem e com tratamentos de plasma de árgon (Ar) e oxigénio (O <sub>2</sub> ). ....	71
Figura 4.20: Fluxos capilares dos filmes porosos de P(VDF-CTFE) com 0 e 10 % de zeólitos, sem e com tratamentos de plasma de árgon (Ar) e oxigénio (O <sub>2</sub> ). ....	72
Figura 4.21: Fotografias de canais impressos com impressora a cera em substratos comerciais e substratos desenvolvidos no âmbito deste trabalho. ....	74
Figura 4.22: Fluxos capilares dos substratos comerciais: a) <i>Whatman n°1</i> ; b) <i>HF090</i> da <i>Millipore</i> , e dos substratos desenvolvidos ao longo deste trabalho sem zeólitos e tratados com plasma de oxigénio: c) fibras de PLLA não orientadas; d) fibras de PLLA orientadas; e) filmes porosos de P(VDF-CTFE); f) filmes porosos de P(VDF-TrFE). ....	74

## Índice de Tabelas

Tabela 2.1: Algumas propriedades dielétricas e eletromecânicas relevantes do PVDF e dos seus copolímeros. Adaptada de [48]. .....	22
Tabela 2.2: Trabalhos relevantes e exemplificativos da utilização da tecnologia microfluídica em diferentes áreas. ....	23
Tabela 3.1: Efeito de parâmetros de processamento de fibras por eletrofiação. ....	33
Tabela 3.2: Resumo dos substratos poliméricos processados no âmbito deste trabalho. ....	39
Tabela 0.1: Tabela resumo dos substratos processados e a sua validação para uso para o desenvolvimento de sistemas microfluídicos. ....	72





## Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

**$\Delta X_c$**  – Grau de cristalinidade

**$\Delta H_m$**  – Entalpia de fusão

**$\Delta H_{cc}$**  – Entalpia de cristalização

**$\Delta H^{\circ}_m$**  – Entalpia de fusão de uma amostra 100% cristalina

***Re*** - Número de *Reynolds*

***p*** - Densidade

***l*** - Dimensão linear

**$\mu$**  - Viscosidade dinâmica

***v*** – Velocidade

**Ar**- Árgon

**DAC** - Desenho assistido por computador

**DMF** - N,N-dimetilformamida

**DMSO** - Dimetilsulfóxido

**DCM** - Diclorometano

**DSC** - Calorimetria diferencial de varrimento

**e.coli** - *Escherichia coli*

**FTIR** - Espectroscopia de infravermelhos com transformada de infravermelhos

**O<sub>2</sub>**- Oxigénio

**PAM** - Poliacrilamida

**PCR** - Reação em cadeia da polimerase

**PDMS** - Polidimetilsiloxano

**PEG** - Polietilenoglicol

**PET** - Polietileno teraflato

**PFA** – Perfluoroalcóxico

**PLLA** - Poli(L-ácido láctico)

**PMMA** - Polimetil-metacrilato

**PS** - Poliestireno

**PTFE** - Politetrafluoretileno

**PVC** - Policloreto de polivinila

**PVDF** - Poli (fluoreto de vinilideno)

**P(VDF-CTFE)** - Poli(fluoreto de vinilideno-*co*-clorotrifluoretileno)

**P(VDF-TrFE)** - Poli(fluoreto de vinilideno-*co*-trifluoretileno)

**P(VDF-HFP)** - Poli (fluoreto de vinilideno-*co*-hexafluoropropileno)

**SEM** - Microscopia eletrônica de varrimento do (*Scanning Electron Microscopy*)

**SU-8** - Éter glicidílico de bisfenol A

**TG** - Temperatura de transição de fase

**TC** - Temperatura de cristalização

**Tm** - Temperatura de fusão



# **1. Introdução**

Neste primeiro capítulo é feita uma contextualização do tema abordado ao longo deste trabalho e são referidos os fatores que motivaram à realização do mesmo, assim como os objetivos propostos.

### **1.1. Contextualização**

A microfluídica é compreendida como uma ciência e tecnologia que permite a manipulação de pequenas quantidades de fluido na ordem dos micro- a nanolitros usando canais na ordem dos micrómetros [1]. Esta área tecnológica oferece a possibilidade de se desenvolverem dispositivos miniaturizados e portáteis, e capazes de desempenharem uma série de funções [1]. Estas características fazem com que sejam aplicados em diversas áreas de elevada relevância social e tecnológica, nomeadamente na área biomédica para o diagnóstico e monitorização de doenças [2-4], com grande ênfase para áreas remotas onde não existe acesso a laboratórios apropriados [5]. Além destas vantagens, os sistemas microfluídicos apresentam um baixo consumo de materiais e consequentemente redução na produção de resíduos, um melhor desempenho através de análises rápidas e precisas e um custo reduzido quando produzido em massa e quando utilizados materiais de baixo custo que permitem o fabrico de dispositivos descartáveis. Devido ao seu reduzido tamanho, como referido anteriormente, podem ser desenvolvidos sistemas compactos e multifuncionais, nos quais as deteções paralelas de vários compostos podem ser realizadas num único dispositivo. Por fim, são geralmente de simples utilização e compreensão [5, 6].

Os primeiros materiais a serem utilizados no fabrico de sistemas microfluídicos surgiram aquando do desenvolvimento da indústria da microeletrónica, como é o caso do silício e do vidro. Nestes o método de fabrico já se encontra bastante desenvolvido [7]. De seguida, com a evolução desta ciência procuraram-se outros tipos de materiais que fossem mais baratos e fáceis de processar, como é o caso dos polímeros mais concretamente os elastómeros [8]. No entanto com o avançar do tempo e com a constante demanda de sistemas portáteis que fossem “amigos do ambiente”, de fácil processamento e fáceis de manipular por qualquer pessoa surgiu o papel (celulose) [5, 6]. Este último é um polímero que acumula uma série de características interessantes como a sua acessibilidade, a sua escalabilidade, a sua biodegradabilidade e a sua fácil associação com

métodos de deteção colorimétricos [5, 6]. Para além destes fatores o método de fabrico da plataforma microfluidica em si é bastante rápido e de baixo custo, podendo ser utilizado métodos de impressão de cera, capazes de imprimir centenas de microcanais em poucos minutos [1]. Embora as inúmeras vantagens apresentadas pelo papel, o mesmo atua meramente como material de suporte, isto é, com ação passiva, sem permitir qualquer controlo nos fluidos. Tendo por base este fator surgiu assim o interesse de se desenvolver e introduzir novos materiais ativos, que além de servir de material de suporte, tenham a funcionalidade de permitir atuar nos fluidos introduzidos nos canais impressos. Deste modo, neste trabalho de dissertação, totalmente inovador, substratos piezoelétricos de base polimérica foram desenvolvidos como materiais alternativos ao papel, mantendo as vantagens do mesmo, mas com funcionalidade acrescentada. De facto, este material tem a particularidade de gerar uma reposta mecânica quanto aplicado um impulso elétrico e vice-versa, fator este que pode ser bastante interessante quando aplicado em sistemas microfluídicos.

## **1.2. Motivação e objetivos do trabalho**

No âmbito daquilo que ficou referido anteriormente, o presente trabalho passou pelo desenvolvimento de substratos de bases polimérica, complementares ao papel, com propriedades eletroativas para aplicação em sistemas microfluidicos. Para tal foram processados vários tipos de polímeros baseados em poli(L-ácido láctico) (PLLA) e poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF), com diferentes morfologias, nomeadamente fibras e filmes porosos por técnicas de eletrofiação (*electrospinning*) e separação de fase induzida por temperatura (*temperature-induced phase separation*), respetivamente. Além disso, a adição de zeólitos com propriedades hidrofílicas e/ou o tratamento dos materiais obtidos com plasma de oxigénio e argon foram realizados de forma a estudar a viabilidade destes processos na diminuição da hidrofobicidade das matrizes poliméricas utilizadas, requisito necessário para aplicação em microfluidica. Após processamento, os materiais obtidos foram devidamente caracterizados em termos de propriedades físicas e químicas. Além disso, ensaios de capilaridade de forma a determinar o fluxo de fluidos passivamente nos substratos desenvolvidos foram realizados. Por fim, canais microfluidicos foram impressos com recurso a impressora de cera de forma a comprovar o potencial dos materiais desenvolvidos para o desenvolvimento de sistemas microfluídicos funcionais.

Deste modo, os objetivos principais do presente trabalho foram os seguintes:

- Processamento de fibras orientadas e não orientadas assim como filmes porosos de PLLA por eletrofiação e separação de fase induzida por temperatura, respetivamente.
- Processamento de filmes porosos de PVDF e respetivos copolímeros por separação de fase induzida por temperatura.
- Estudo da influência da adição de zeólitos na matriz polimérica e de tratamentos de plasma na hidrofobicidade dos materiais desenvolvidos.
- Caracterização físico-química dos materiais desenvolvidos, nomeadamente em termos morfológicos, hidrofobicidade, fases cristalinas, propriedades térmicas.
- Estudo de fluxo de fluídos por capilaridade recorrendo a corantes alimentares.
- Desenho e impressão de canais microfluídicos por impressão a cera e respetiva avaliação.

### **1.3. Estrutura da dissertação**

A tese está organizada em 5 capítulos sumarizados de seguida.

#### **Capítulo 1. Introdução**

O presente capítulo apresenta uma contextualização do tema do presente trabalho, assim como a motivação para a realização do mesmo e os objetivos pretendidos.

#### **Capítulo 2. Enquadramento teórico**

Neste capítulo é feita uma apresentação de conceitos gerais da microfluídica, bem como as características dos diferentes materiais utilizados para fabrico oferecendo ainda uma contextualização histórica. No final é feita uma abordagem bibliográfica de diferentes aplicações desta área tecnológica.

#### **Capítulo 3. Materiais e métodos**

Neste capítulo são descritos os materiais utilizados no âmbito deste trabalho, assim como os procedimentos laboratoriais para o processamento dos mesmos. Além disso, é feita uma breve descrição teórica dos métodos de caracterização utilizados.

#### **Capítulo 4. Resultados e discussão**

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos ao longo do trabalho.

#### **Capítulo 5. Conclusões e perspectivas futuras**

Neste último capítulo são apresentadas as conclusões e são tecidos alguns comentários finais. Por fim, são sugeridos alguns possíveis trabalhos futuros enquadrados no âmbito desta dissertação.



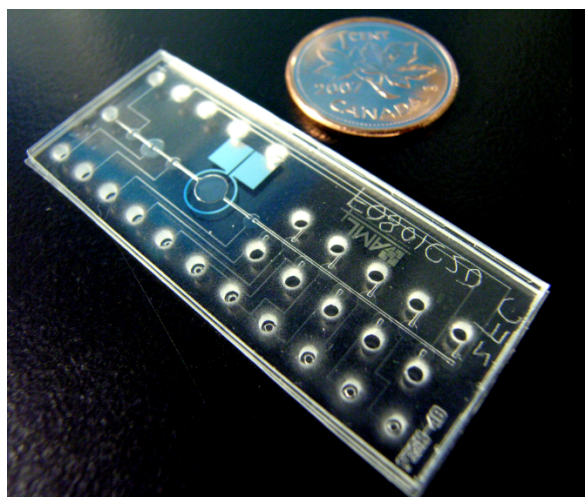
## **2. Enquadramento teórico**



## 2.1. Microfluídica

### 2.1.1. Introdução

A microfluídica é uma área interdisciplinar que liga as mais diversas áreas das ciências como a dinâmica de fluidos, a física, a química, entre outras. Compreende-se esta área como sendo uma tecnologia capaz de manipular volumes de fluido na ordem dos micro- e nanolitros quando estes se encontram confinados em canais na ordem dos micro- e nanómetros [1]. Associados a esta área encontram-se os famosos *lab-on-a-chip* [9] e *organ-on-a-chip* [10], dispositivos de reduzidas dimensões (Figura 2.1) que são capazes de incorporar diversas funções laboratoriais ou biológicas num único sistema [11]. As primeiras aplicações da microfluídica surgiram associadas com a separação e análise de analitos devido as vantagens inerentes da miniaturização incluindo, entre outras, a reduzida quantidades de amostra e reagente necessária [1], os curtos tempos de análise [9], a capacidade de integrar diversos componentes num único dispositivo [1] e o baixo custo [1, 10].



**Figura 2.1:**Fotografia ilustrativa das reduzidas dimensões de um sistema microfluídico. Adaptado de [11].

Abordando um pouco a história desta tecnologia, foi por volta dos anos 50 que foram apresentados os primeiros avanços na microfluídica. Surgiram técnicas de separação e análise de partículas como a cromatografia gasosa [12] e líquida [13]. Constatou-se que com uma redução do tamanho dos canais e com um melhor empacotamento das partículas alcançava-se uma melhor separação das partículas. Anos mais tarde surgiu a técnica de eletroforese capilar [14] para substituir a técnica tradicional. Esta última consiste no uso de um gel de agarose para a separação de

partículas carregadas eletricamente. Esta nova técnica com o recurso a capilares permite uma maior dissipação do calor devido a uma maior área superficial, mitigando o efeito de joule proveniente da aplicação de um campo elétrico. Deste modo, um maior campo elétrico pode ser aplicado, resultando na obtenção mais rápida e eficiente dos resultados [14, 15]. Com o avanço destes novos métodos de microanalítica surgiu o interesse de se introduzirem plataformas microfluídicas que compreendessem estes métodos. Outro dos fatores que contribuiu para o desenvolvimento da microfluídica foi a necessidade da criação de programas de defesa por parte do governo norte americano nos anos 90 aquando do fim da guerra fria. Uma das áreas exploradas por este programa foi a criação de dispositivos microfluídicos capazes de detetar possíveis ameaças químicas e biológicas [1]. O último fator, mas talvez o mais preponderante para o progresso desta área tecnológica, foi o aparecimento da microeletrónica. Com isso, técnicas como a litografia suave e microfabricação foram desenvolvidas e permitiram o fabrico dos primeiros dispositivos microfluídicos em silício e vidro [16].

### 2.1.2. Características gerais

Devido às pequenas dimensões e tipicamente baixo fluxo volumétrico nos microcanais dos sistemas microfluídicos, o fluxo é laminar [17] com números de Reynolds ( $Re$ ) geralmente inferior a 100. O  $Re$  apresentado na equação 2.1 é um parâmetro adimensional que representa a razão entre as forças inerciais e as forças viscosas:

$$Re = \frac{\rho v l}{\mu} \quad (\text{Equação 2.1})$$

onde  $\rho$  é a densidade ( $\text{kg.m}^{-3}$ ),  $v$  é a velocidade ( $\text{m.s}^{-1}$ ),  $\mu$  é a viscosidade dinâmica ( $\text{Pa.s}$ ) e  $l$  é a dimensão linear característica ( $\text{m}$ ). É possível verificar assim que um dos fatores dominantes desta fórmula é a dimensão dos canais onde se encontra o fluido [18]. Por exemplo, para uma cavidade retangular,  $l$  é representado pela largura e altura da secção transversal da cavidade retangular. Num sistema de fluxo laminar, os efeitos viscosos dominam os efeitos de inércia. Deste modo, fluidos fluem paralelamente num microcanal e a transferência de massa convectiva ocorre apenas por difusão na direção do fluxo, pelo que a mistura é obtida apenas por difusão molecular e convecção, sendo desde modo lento. Esta propriedade intrínseca dos sistemas microfluídicos constitui uma limitação em aplicações que requerem a reação da amostra com reagente de forma a obter um resultado quantificável, como é o caso de muitas análises cínicas de biomoléculas em

fluidos biológicos [17]. Para colmatar esta limitação, diferentes métodos de mistura foram desenvolvidos. Dentro destes existem os métodos passivos que envolvem a alteração da geometria dos canais e/ou na introdução, por exemplo, de estruturas que perturbem o fluxo como micropilares [19], de forma a maximizar a área superficial de contacto, reduzir o comprimento de difusão e assim permitir uma mistura mais eficiente dos fluidos. Por outro lado, os métodos ativos envolvem a integração de sistemas de atuação através de forças externas que irão perturbar o fluxo e assim acelerar o processo de mistura. Um exemplo passa pela introdução de um atuador piezoelétrico capaz de produzir ultrassons e por consequência aumentar a taxa de mistura de fluidos [20]. Como referido anteriormente, dispositivos nesta escala apresentam fenómenos como a tensão superficial (fenómeno físico que ocorre na interface de duas fases químicas e que relaciona as forças de coesão e adesão) e o efeito capilar (capacidade que uma substância tem para atrair outra para perto de si) que são os fatores dominantes em relação à força gravítica. Outra característica a salientar é a elevada homogeneidade calorífica apresentada por estes [15].

## **2.2. Materiais convencionais e técnicas de fabrico**

Nos dias de hoje existem diversos tipos de materiais aplicados no desenvolvimento de sistemas microfluídicos, assim como diferentes métodos de fabrico. De seguida, serão descritos os mais relevantes juntamente com as principais vantagens e limitações.

### **2.2.1. Silício e Vidro**

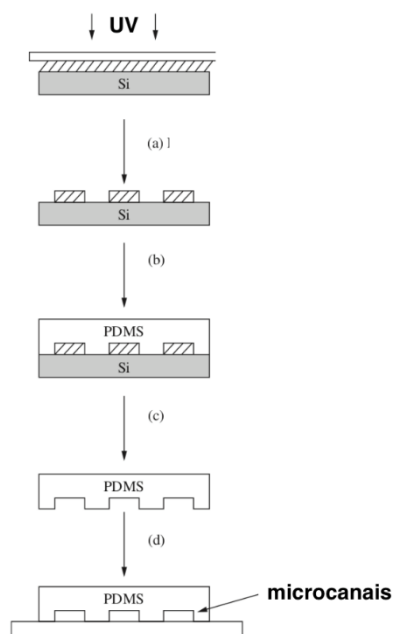
Um dos parâmetros mais importantes a ter em consideração antes do desenvolvimento de um sistema microfluídico é a escolha do material. De facto, cada material possui determinadas características que terão de ser estudadas e assim como técnicas de fabrico associadas que irão influenciar no preço de cada dispositivo produzido assim como na aplicação que se pretende dar ao mesmo. Os primeiros materiais a serem utilizados nesta área foram o silício e o vidro e são normalmente processados por técnicas de fabrico bem conhecidas pela indústria dos semicondutores, tais como micromaquinagem volumétrica (*bulk micromachining*) utilizando corrosão química e corrosão a seco, ou micromaquinagem superficial (*surface micromachining*). A

micromaquinagem volúmica produz estruturas dentro do substrato, ou seja, o substrato é seletivamente corroído, utilizando a fotolitografia de forma a transferir um padrão de uma máscara para a superfície. Por sua vez, a micromaquinagem superficial cria estruturas no topo do substrato, o que significa que camadas finas de silício são depositadas sucessivamente recorrendo a técnicas de deposição química. Enquanto o silício é transparente a luz infravermelha mas não a luz visível, o vidro é ópticamente transparente [21]. Propriedades favoráveis do silício e vidro advêm das suas elevadas estabilidades térmica e química. Além disso, tal como o silício, as modificações químicas do vidro são baseadas em silanol. Deste modo, a adsorção não específica pode ser reduzida ou o crescimento celular, se for o objetivo da aplicação em causa, melhorada através da modificação química da superfície [22]. No entanto, a dureza do silício e do vidro, o elevado custo e tempo de fabrico, a dificuldade em selar a estrutura microfluidica e de integrar unidades funcionais, juntamente com a não permeabilidade a gases impendem a sua utilização em muitas aplicações. Por consequente, o desenvolvimento de sistemas microfluidicos utilizando outros materiais que podem ser facilmente fabricados e que sejam compatíveis com uma maior gama de aplicações tornou-se uma necessidade [23].

### **2.2.2. Polímeros**

Sistemas microfluidicos baseados em polímeros são uma alternativa interessante, por serem relativamente baratos, passíveis de processos de produção em massa e facilmente modificados quimicamente. Um benefício adicional é a ampla gama de polímeros disponíveis que oferece uma grande flexibilidade na escolha de materiais com propriedade específicas. De acordo com as suas propriedades físicas, os polímeros podem ser classificados em termoendurecíveis, elastómeros e termoplásticos. Termoendurecíveis como a resina SU-8 são normalmente estáveis mesmo a altas temperaturas, resistentes à maioria dos solventes, biocompatíveis e apresentam uma boa transparência e boas propriedades mecânicas. O SU-8 permite a fabricação de microestruturas com elevada razão altura/largura utilizando a técnica de fotolitografia. Quando adequadamente aquecido e exposto a luz ultravioleta com um comprimento de onda específico utilizando fotomáscaras de elevada resolução com um padrão inverso (uma vez que a resina é negativa), as partes não expostas, contrariamente as partes expostas, são solúveis e assim removidas durante o processo de revelação [16, 24]. Deste modo, SU-8 tem sido utilizado diretamente como material estrutural para a fabricação de unidades funcionais (como por exemplo sistemas eletromecânicos)

e frequentemente como molde para o fabrico de sistemas microfluídicos baseados no polidimetilsiloxano (PDMS), o elastómero mais popular em microfluídica [16, 22]. Neste último caso, durante o processo, denominado de moldagem por réplica, o pré-polímero líquido de PDMS é vertido num molde, termicamente curado (entre 40 e 100 °C) e descolado facilmente devido à sua baixa tensão superficial (Figura 2.2). Para selar os canais microfluídicos abertos, o PDMS pode ser ligado de forma reversível a PDMS, vidro ou outros substratos por simples contacto ou irreversivelmente utilizando tratamentos de superfície com plasma de oxigénio ou com recurso a uma fina camada de PDMS por curar como cola [25].



**Figura 2.2:** Método de fabricação de microcanais em PDMS por litografia suave (fotolitografia de SU-8, seguido de moldagem por réplica do PDMS): a) fabrico do molde em SU-8 por fotolitografia utilizando um substrato de silício b) PDMS no estado liquido é vestido sobre o molde e curado a uma temperatura entre os 40 e a 100°C até total endurecimento c) remoção da estrutura em PDMS d) selagem da estrutura em PDMS. Adaptado de [26].

O PDMS apresenta propriedades muito interessantes para o fabrico de unidades funcionais (tais como válvulas e bombas) e/ou fabrico de sistemas microfluídicos em PDMS para aplicações biotecnológicas por apresentar uma elevada biocompatibilidade, uma matriz porosa permeável a gases, uma elevada elasticidade e um custo razoável [8, 27]. Contudo, a ligação não específica de moléculas hidrofóbicas nas paredes dos canais devido a elevada hidrofobicidade da superfície

do PDMS, juntamente com a evaporação de água através dos canais podem causar uma alteração da concentração e composição do fluido. Várias estratégias, como a modificação química da superfície ou a utilização de fluxos contínuos podem ser abordadas para superar esta limitação. No que diz respeito aos termoplásticos, devido à sua ampla utilização na indústria, o seu processamento por termomoldagem é muito bem conhecido [28]. Neste caso, milhares de estruturas podem ser produzidas com elevada taxa e baixo custo utilizando moldes de metal ou silício e altas temperaturas. No entanto, o fabrico deste tipo de molde é demorado e caro, não sendo consequentemente muito utilizado em investigação e prototipagem. Abordagens típicas para selagem dos microcanais incluem ligação recorrendo a elevadas temperaturas e a cola [29]. Os termoplásticos apresentam a interessante capacidade de serem remodelados várias vezes após reaquecimento. Polimetil-metacrilato (PMMA), poliestireno (PS), polietileno tereftalato (PET) e policloreto de polivinila (PVC) são termoplásticos típicos utilizados no fabrico de sistemas microfluídicos[30]. Embora este tipo de materiais mostrem uma compatibilidade com solventes ligeiramente melhor que o PDMS, são pouco permeáveis a gases e a sua rigidez dificulta o fabrico de unidades funcionais. Por sua vez, embora as suas temperaturas de fusão sejam altas (acima dos 280 °C), os polímeros perfluorados, como o perfluoroalcóxido (conhecido como Teflon PFA) e politetrafluoretileno (conhecido como Teflon PTFE), apresentam uma boa permeabilidade a gases, elasticidade suficiente para fabricar unidade funcionais, são quimicamente inertes a solventes e químicos, apresentam uma baixa adsorção de proteínas não específicas comparativamente ao PDMS, têm uma boa biocompatibilidade celular e também uma boa transparência ótica [31]. Recentemente, hidrogéis, que são redes reticuladas tridimensionais de polímeros hidrofílicos, receberam um grande interesse em aplicações biológicas, especialmente para fins de engenharia de tecidos [32] e desenvolvimento de fármacos [33]. Eles podem ser feitos por quase qualquer polímero solúvel em água, permitindo uma ampla gama de propriedades físico-químicas. Exemplos são hidrogéis derivados de animais como colagénio, hidrogéis derivados de plantas tais como arginato e agarose e hidrogéis sintetizados tais como polietilenoglicol (PEG) e poliacrilamida (PAM). A sua estrutura porosa controlável, biodegradabilidade e biocompatibilidade promovidas pelo alto teor de água em hidrogéis tornam-nos candidatos interessantes para mimetizar a matriz extracelular, tanto em termos de composição como mecanicamente [28]. Contudo, os hidrogéis ainda apresentam vários desafios. Exemplos são a dificuldade em fabricar tecidos funcionais e complexos, principalmente devido a sua reduzida capacidade de difusão de nutrientes e oxigénio. No entanto, com a introdução de novos hidrogéis e tecnologias de



microengenharia nos últimos anos, avanços importantes têm sido feitos na fabricação de redes porosas aprimoradas e sistemas microfluídicos que têm o potencial de produzir tecidos funcionais com melhor vascularização e capacidade de oferecer e controlar comportamentos celulares tridimensionalmente, mimetizando assim de forma mais próxima as condições naturais para estudos biológicos e de patologias [34].

Apesar da enorme popularidade dos materiais apresentados anteriormente, os métodos de fabrico podem ser considerados uma limitação pois são bastante morosos e necessitam de pessoal especializado [35]. Isto torna-se ainda mais evidentes para aplicações que requerem sistemas que possam ser descartáveis de forma a evitar contaminações entre amostras, fáceis de manusear e que permitem medições *in situ* por qualquer pessoa. Por este motivo, surgiu a necessidade iminente de implementar um material em que o seu processo de fabrico fosse mais simples, menos dispendioso e cujo sistema desenvolvimento fosse possível de ser utilizado por qualquer pessoa em qualquer local.

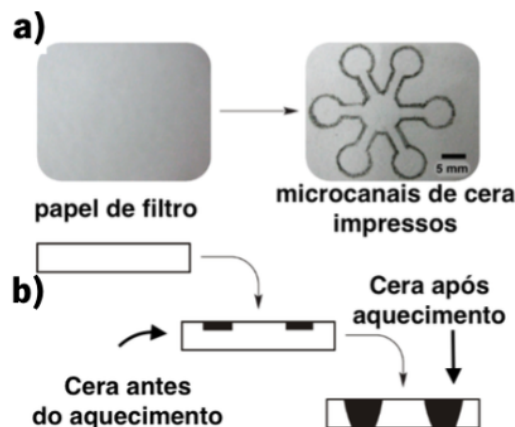
### **2.2.3. Papel**

A celulose vulgarmente conhecida como papel apresenta uma série de características que a torna particularmente aliciante para ser aplicada no desenvolvimento de dispositivos microfluídicos, particularmente para diagnóstico e monitorização de patologias [36]. Embora se trata de um polímero de cadeia longa composto por um só monómero (glicose) classificado como polissacarídeo ou carbohidrato, o papel é abordado separadamente dos restantes polímeros pela importância que se têm dado nos últimos anos e por ser utilizado como substrato bidimensional contrariamente aos sistemas poliméricos tridimensionais apresentados anteriormente. O papel tem a vantagem de apresentar um custo muito reduzido comparativamente ao silício e ao PDMS, não só no que diz respeito a matéria-prima, mas também pelo processo de fabrico dos sistemas microfluídicos ser relativamente simples [36, 37]. Sendo o papel de natureza hidrofílica, barreiras hidrofóbicas devem ser criadas de forma a confinar os fluidos em canais. Um processo bastante utilizado é o de impressão a cera (Figura 2.3). Este processo permite imprimir barreiras hidrofóbicas, característica inerente da cera, em poucos minutos com intervenção mínima [36, 38]. De facto, o processo de produção destes microcanais pode ser descrito em três passos. Primeiramente os microcanais são desenhados num programa de desenho assistido por

computador (DAC). De seguida os microcanais são impressos utilizando uma impressora própria para o efeito. Por fim, o papel impresso é colocado sobre uma placa de aquecimento para que a cera derreta e penetre o papel formando as barreias hidrofóbicas que vão conter o fluido (Figura 2.4) [38, 39].



**Figura 2.3:** Método de impressão a cera em papel: a) desenho dos microcanais num programa DAC; b) impressão através de uma impressora própria para o efeito; c) aquecimento da cera para penetrar o papel. Adaptado de [40].



**Figura 2.4:** Representação esquemática da formação dos microcanais, quando a cera hidrofóbica aquece e atravessa toda a espessura do substrato de papel. Adaptado de [41].

Aliado à enorme vantagem que o processo de produção acarreta pela sua rapidez e baixo custo, a própria constituição do papel é um enorme benefício. De facto, por possuir uma estrutura porosa permite não só filtrar (de acordo com o tamanho do poro é possível uma separação das partículas) mas mais importante ainda gerar fluxos passivamente através do fenómeno de capilaridade fazendo com o que o fluido se movimente sem necessidade de componentes externos [37, 42]. Dos diversos papeis disponíveis comercialmente, um dos mais utilizados nesta área é o papel de filtro *Whatman no. 1* [39], que apresenta uma estrutura constituída por fibras não orientadas e achatadas. Atualmente, outros tipos de substratos desenvolvidos especialmente para a indústria

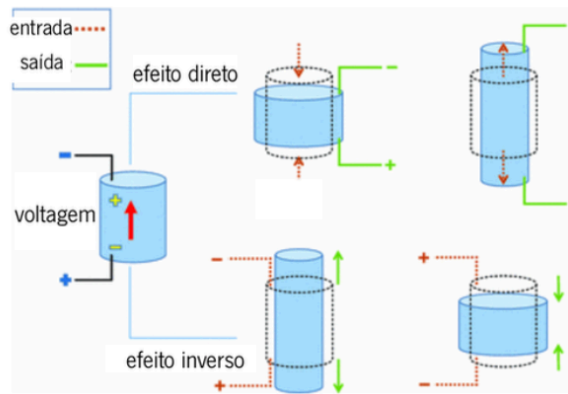
microfluídica podem ser encontrados. A gama *Hi-Flow Plus Membranes* da *Millipore* apresenta diversos substratos com propriedades estruturais diferentes. Neste caso, os substratos apresentam uma estrutura porosa com tamanho de poro controlado permitindo a escolha do material de acordo com a aplicação em causa, nomeadamente tamanho de poro pretendida em caso de filtragem e velocidade de fluxo. A título de exemplo o *HF180* permite um fluxo capilar de  $180 \pm 45 \text{ s.4cm}^{-1}$ , enquanto que o *HF075* permite velocidades superiores de  $75 \pm 19 \text{ s.4cm}^{-1}$ . Por outro lado, contrariamente ao *HF075* que filtra entidades com tamanho igual ou superior a  $500 \mu\text{m}$ , o *HF180* tem tendência a filtrar entidades com tamanho igual ou superior a  $400 \mu\text{m}$ . Além das vantagens apresentadas anteriormente, o papel é um material biocompatível e biodegradável [42] e a cera utilizada para a formação dos canais é facilmente decomposta [43]. Por se tratar de um material branco, oferece o contraste necessário para aplicação de métodos de deteção por colorimetria. Aliando todas estas propriedades é possível fabricar dispositivos simples, portáteis, económicos e com um elevado grau de eficiência, sendo assim promissor para variadas aplicações biomédicas. Um exemplo típico e mundialmente conhecido é o teste de gravidez [44]. É possível justificar assim o porquê de existirem diversos sistemas microfluídicos atualmente comercializados que têm por base esta matéria-prima. Dispositivos para a medição da quantidade de glucose no sangue [45], para a deteção de doenças como o caso da malária [46], da sida [47], entre outros, estão disponíveis comercialmente e perfeitamente implementados no nosso dia a dia.

Apesar de toda esta panóplia de argumentos positivos relativamente ao uso deste material para sistemas microfluídicos, é importante reforçar o facto do mesmo servir apenas como material de suporte, não permitindo qualquer ação sobre o fluido. Consequentemente, surgiu o interesse de se explorarem e introduzirem novos materiais, mais especificamente materiais poliméricos ativos e inteligentes como é o caso do PLLA e do PVDF utilizados no âmbito deste trabalho.

### **2.3. Materiais poliméricos inteligentes**

Um polímero inteligente ou ativo considera-se como sendo um polímero que altera uma ou mais propriedades quando aplicado um estímulo externo como uma alteração do pH ou da temperatura ou a aplicação de um campo elétrico ou magnético. Dentro deste grande grupo encontra-se um grupo de particular interesse que são os polímeros piezoelétricos capazes de gerar cargas elétricas

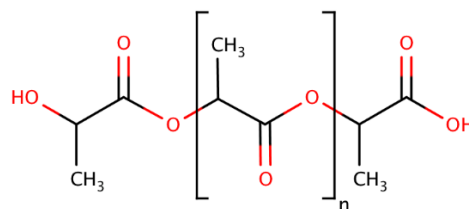
através da aplicação de uma força mecânica (efeito piezoelétrico direto) e sofrer uma deformação mecânica quando sujeito a um campo elétrico (efeito piezoelétrico inverso) (Figura 2.5) [48, 49]. O efeito piezoelétrico direto é utilizado em aplicações envolvendo sensores, enquanto o efeito piezoelétrico inverso é utilizado em aplicações envolvendo atuadores.



**Figura 2.5:** Comportamento de um material piezoelétrico: efeito piezoelétrico direto e efeito piezoelétrico inverso. Adaptado de [50].

### 2.3.1. Poli (L-ácido láctico)

O PLLA é um estereoisômero do poli(ácido láctico) (PLA) (Figura 2.6) e caracteriza-se como sendo um termoplástico biodegradável, biocompatível e piezoelétrico. Uma das grandes vantagens para sua utilização advém do facto de ser ecologicamente amigo do ambiente pois é extraído de fontes naturais como é o caso da cana de açúcar ou do amido de milho [51]. O PLLA é bastante utilizado nos dias de hoje para aplicações biomédicas, nomeadamente em engenharia de tecidos [52].



**Figura 2.6:** Representação da estrutura química do PLLA.

Em relação às suas propriedades térmicas apresenta um ponto de fusão de 170-180 °C e uma temperatura de transição vítrea de 55-65 °C [53]. Para além disto apresenta um coeficiente piezoelétrico de  $\approx 10 \text{ pC.N}^{-1}$  [52]. O PLLA pode ser processados em diferentes morfologias de acordo com o método de processamento, sendo exemplos esferas, fibras, membranas porosas, entre outros [54, 55].

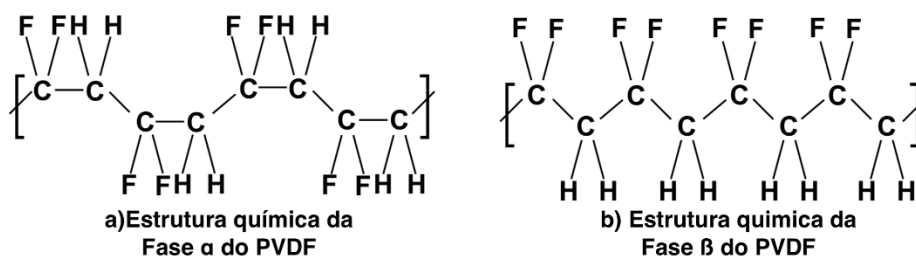
Todas estas propriedades tornam este material promissor para o fabrico de substratos microfluídicos, alternativos ao papel.

### **2.3.2. Poli(fluoreto de vinilideno)**

O PVDF tem vindo a ser muito estudado e aplicado na área biomédica devido a um conjunto de características que este apresenta. É um material semi-cristalino, quimicamente inerte, flexível, biocompatível e com um elevado coeficiente piezoelétrico [48].

O PVDF é sintetizado pela polimerização do monómero fluoreto de vinilideno (VDF),  $\text{CH}_2=\text{CF}_2$ . Quando produzido como homopolímero, ou seja, a partir de 100 % de VDF, a maioria das cadeiras de PVDF possuem uma estrutura regular com grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CF}_2$  alternados. No entanto, o polímero contém, ocasionalmente, unidades poliméricas investidas dando origem aos denominados grupos invertidos. Sob condições típicas de polimerização, a quantidade de grupos invertidos está compreendida entre 3 e 6%, embora valores mais elevados possam ser obtidos recorrendo a processos específicos. Esta condição é importante uma vez que influencia a estrutura cristalina do polímero e por consequente as suas propriedades eletroativas.

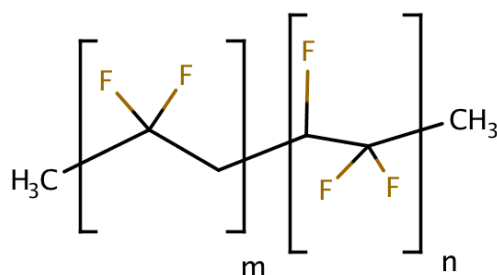
Uma característica interessante do PVDF é o seu polimorfismo pouco comum entre os materiais poliméricos, podendo assim cristalizar em 5 fases cristalinas mediante a conformação que a cadeia apresenta. Dentro destas destacam-se duas em concreto: a fase  $\alpha$  (Figura 2.7a) e a fase  $\beta$  (Figura 2.7 b).



**Figura 2.7:** Estrutura química das duas principais fases do PVDF: a) Fase  $\alpha$ ; b) Fase  $\beta$ . Adaptado de [56].

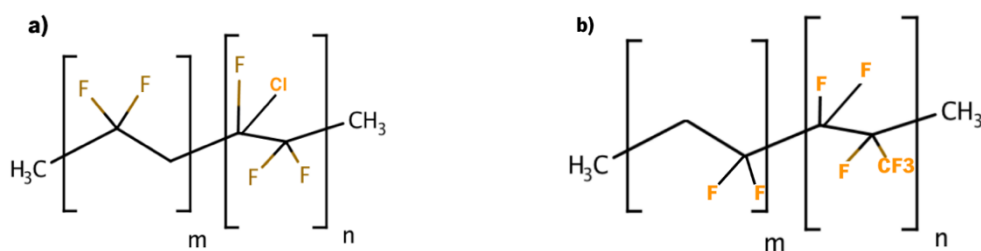
A fase  $\alpha$  apresenta-se como sendo termodinamicamente mais estável, no entanto não apresenta eletroatividade. Esta fase diz-se como sendo uma fase apolar devido à orientação aleatória dos dipolos [57]. Este polímero nesta fase é comumente usado como um material isolador devida à sua baixa condutividade térmica e à sua elevada resistência química e térmica [58]. No que diz respeito à fase  $\beta$  esta diz-se como sendo polar, pois contrariamente à fase apolar, os dipolos encontram-se alinhados na mesma direção (conformação *all-trans*). Esta característica faz com que o polímero se encontre eletricamente ativo. Embora esta fase possa ser obtida por diferentes técnicas, a mais reportada para obtenção de filme densos na fase  $\beta$  advém do estiramento mecânico de filmes originalmente  $\alpha$  a temperaturas inferiores a 100 °C [59]. Quando cristalizado a temperatura ambiente, filmes na fase  $\beta$  são igualmente obtidos, mas com uma morfologia porosa e não densa.

Com o objetivo de melhorar as propriedades do PVDF e assim aumentar o leque de possíveis aplicações, diferentes copolímeros foram desenvolvidos. Um dos copolímeros do PVDF mais estudado é o poli(fluoreto de vinilideno-*co*-trifluoretileno) (P(VDF-TrFE)), por se apresentar na fase cristalina tipo  $\beta$  independentemente do método de processamento, fruto da substituição de um dos hidrogénios por um átomo de flúor adicional. O TrFE atua assim como uma fonte de grupos invertidos, quando copolimerizado com o VDF, formando espontaneamente a conformação *all-trans* (Figura 2.8). Além disso, apresenta uma maior estabilidade a elevadas temperaturas em relação ao PVDF.



**Figura 2.8:** Estrutura química do P(VDF-TrFE).

Além do P(VDF-TrFE), outros copolímeros como o poli(fluoreto de vinilideno-*co*-clorotrifluoretileno) (P(VDF-CTFE)) e o poli(fluoreto de vinilideno-*co*-hexafluoropropileno) P(VDF-HFP) têm sido reportados e aplicados em diversas áreas. O P(VDF-CTFE) é formado pela adição de uma molécula de cloro no monómero de trifluoretileno (Figura 2.9a). Este copolímero apresenta igualmente propriedades piezoelétricas, maior resposta de deformação eletrostritiva e maior constante dielétrica comparativamente ao PVDF. A introdução do CTFE resulta numa orientação mais fácil dos dipolos sob campo elétrico externo, podendo a constante piezoelétrica atingir valores de 140 pC.N<sup>-1</sup> [60]. O P(VDF-HFP), por sua vez, consiste na introdução da fase amorfa de hexafluoropropileno no homopolímero PVDF (Figura 2.9b). Este copolímero tem sido maioritariamente estudado no desenvolvimento de baterias de lítio e para a produção de membranas de pervaporação. Isto deve-se ao facto do P(VDF-HFP) ser quimicamente inerte e apresentar uma baixa cristalinidade quando comparado com o PVDF.



**Figura 2.9:** Estrutura química do: a) P(VDF-CTFE) e b) P(VDF-HFP).

A Tabela 1 resume algumas propriedades relevantes do PVDF e do seus copolímeros.

**Tabela 2.1:** Algumas propriedades dielétricas e eletromecânicas relevantes do PVDF e dos seus copolímeros. Adaptada de [48].

	PVDF	P(VDF-TrFE)	P(VDF-CTFE)	P(VDF-HFP)
Constante piezoelétrica $d_{31}$ (pC.N <sup>-1</sup> ) ou deformação eletrostritiva longitudinal*	8-22	12	5.5%*	30
Constante piezoelétrica $d_{33}$ (pC.N <sup>-1</sup> )	-24 a -34	-38	-140	-24
Coefficiente eletromecânico $k_{33}$	0.20	0.29	0.39	0.36
Coefficiente dielétrico $\epsilon'$	6-12	18	13	11

Aliado às boas características dos materiais baseado em PVDF, estes podem ser processados de várias formas de acordo com o método de fabrico. De facto, a título de exemplo, esferas e fibras podem ser obtidas recorrendo a técnicas de eletrofiação [61], enquanto que filmes porosos podem ser obtidas pela técnica de separação de fase induzida por temperatura [62], podendo-se assim processar substratos com estruturas e morfologias similares ao papel utilizado em microfluídica.

No entanto, tal com o PLLA, o PVDF apresenta uma elevada hidrofobicidade tornando a sua aplicação direta em microfluídica difícil. Para ultrapassar esta limitação abordagens como a introdução de entidades hidrofílicos (tais como zeólitos) na matriz polimérica ou tratamentos de superfície por plasma podem ser utilizados. Estas abordagens já se comprovaram eficientes no caso do PVDF, tendo reduzido drasticamente a hidrofobicidade de superfície [55, 63].

## 2.4. Estado da arte

A microfluídica é uma tecnologia que tem sido aplicada em diversas áreas tais como a medicina, a monitorização ambiental, a biologia e a farmacêutica. A Tabela 2.2 exemplifica alguns trabalhos relevantes realizados nestas áreas, a funcionalidade a que se dedicam e o material utilizado para o fabrico do sistema microfluídico.



**Tabela 2.2:** Trabalhos relevantes e exemplificativos da utilização da tecnologia microfluídica em diferentes áreas.

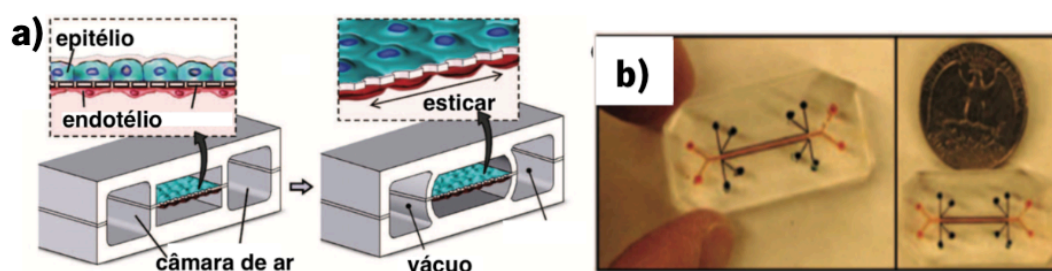
<b>Áreas de aplicabilidade</b>	<b>Tipo de Aplicação</b>	<b>Tipo de Material usado</b>	<b>Referência</b>
<b>Dispositivo de Diagnóstico</b>	Dispositivo que deteta os níveis de glucose no sangue	Celulose	[64]
	Teste de gravidez	Celulose	[44]
<b>Ensaaios Clínicos</b>	Mimetização de um rim através de um sistema microfluídico	PDMS	[65]
	Mimetização de um pulmão através de um sistema microfluídico	PDMS	[66]
<b>Ambientais</b>	Dispositivo para monitorização da qualidade da água	Celulose	[67]
	Dispositivo colorimétrico para deteção da presença de salmonela	Celulose	[68]
<b>Genética</b>	Dispositivo microfluídico utilizado para deteção de uma anomalia na cadeia de nucleótidos	Silício e Vidro	[69]
	Dispositivo utilizado para a realização de eletroforese	PMMA	[70]
<b>Terrorismo</b>	Dispositivo microfluídico desenvolvido para detetar uma plenitude de agentes biológicos e químicos	PDMS	[71]

Diversos sistemas microfluídicos têm vindo a ser desenvolvidos para uma panóplia de aplicações distintas recorrendo a diferentes materiais de acordo com os requisitos exigidos. Materiais como o silício e o vidro foram utilizados para o desenvolvimento de sistemas miniaturizados capazes de replicar técnicas laboratoriais. Um destes foi desenvolvido por Zhu *et al.* no âmbito da ciência genética. O dispositivo é responsável por procurar anomalias nos nucleótidos presentes numa cadeia de ácido desoxirribonucleico (ADN). Além disso, este tipo de sistema demonstrou ser capaz de realizar diversas funções laboratoriais, nomeadamente de executar uma replicação das cadeias de ADN e separação das cadeias em simultâneo. [69].

Um das técnicas mais comumente usada em laboratórios biológicos é a eletroforese. Esta consiste na separação analítica de moléculas biológicas baseando-se no princípio de migração de

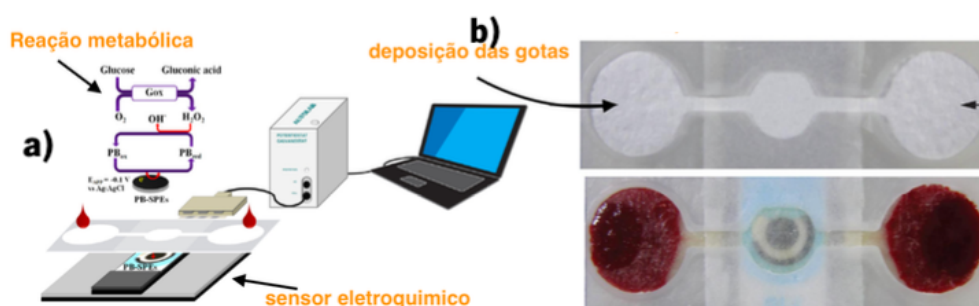
iões sob efeito de um campo elétrico. Chen *et al.* desenvolveram um dispositivo microfluídico em PMMA capaz de ultrapassar uma das limitações apresentadas pela técnica convencional, sendo este o efeito de Joule que afeta a velocidade e eficiência das separações eletroforéticas. Por se tratarem de canais microfluídicos o calor gerado pelo campo elétrico é facilmente dissipado [70].

Outra das áreas onde estão a ser realizados grandes avanços é nos ensaios clínicos, onde sistemas denominados de *organ-on-a-chip* estão a ser desenvolvidos com o objetivo de mimetizar órgãos em sistemas de dimensões na ordem dos micrómetros. Na tabela anterior exemplificou-se dois destes dispositivos: um capaz de mimetizar um rim [65] e outro capaz de mimetizar um pulmão [66]. Ambos são casos patentes que demonstram a necessidade de se explorar esta vertente. Com estes sistemas miniaturizados, uma serie de limitações adjacentes aos ensaios clínicos tradicionais são ultrapassados. Por exemplo a capacidade de diminuir o custo e o tempo que se leva ao desenvolvimento de um fármaco e a redução, senão abolição, de ensaios em animais e humanos. Um exemplo deste tipo de dispositivo encontra-se representado na Figura 2.10. O mesmo foi fabrico recorrendo ao material PDMS, um elastómero que possui a capacidade de se comprimir e de se estender, sendo capaz assim de replicar os movimentos fisiológicos de um pulmão. Através da aplicação de vácuo nas cadeias laterais estas criam uma espécie de estiramento mecânico, replicando o processo de respiração. A presença de uma membrana porosa demonstra a capacidade de mimetizar as células pulmonares e as trocas gasosas existentes nestas.



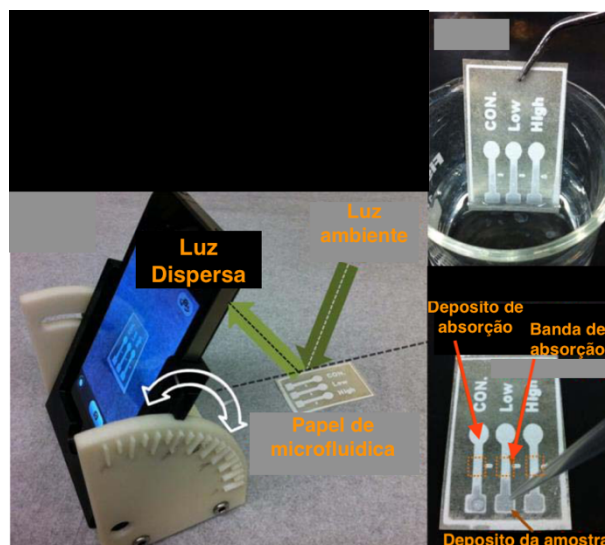
**Figura 2.10:** Sistema microfluídico capaz de mimetizar um pulmão: a) método de funcionamento do *lung-on-a-chip*; b) perspectiva da dimensão do sistema. Adaptado de [66] .

Na área dos dispositivos de diagnóstico e análises biomédicas, muito têm vindo a ser desenvolvido ao longo dos anos. Um sistema microfluídico muito comum é usado por pacientes diabéticos e serve para medir os níveis de glucose no sangue. Um exemplo deste tipo de sistema foi desenvolvido por Noiphung *et al.* O dispositivo em celulose possui dois reservatórios onde o plasma sanguíneo é colocado (Figura 2.11). O plasma flui por capilaridade para a zona central onde existe um detetor. Este opera através de uma reação química, que se baseia no uso de uma enzima (glucose oxidase) para catalisar a produção de peróxido de hidrogénio a partir da glucose e do oxigénio [64]. No final o produto obtido da reação passa por um filtro hidrofílico atingindo um sensor eletroquímico que irá quantificar os valores obtidos. O famoso teste de gravidez também utiliza a celulose como principal substrato, mas ao invés do método de quantificação anterior utiliza um método de identificação colorimétrico, tornando possível a leitura dos resultados por qualquer utilizador.



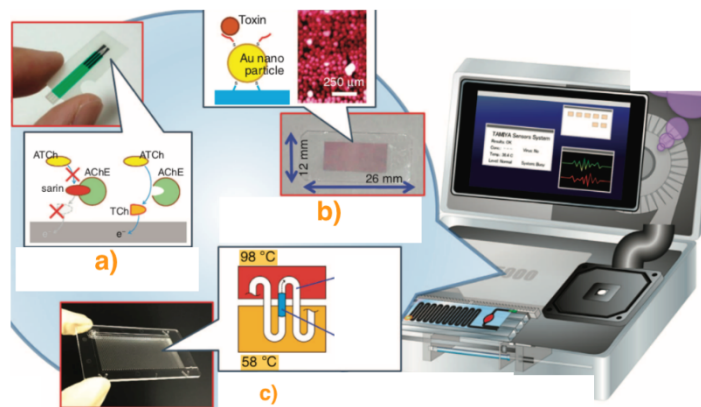
**Figura 2.11:** Sistema microfluídico para quantificação de glucose no sangue: a) método de funcionamento do sistema b) fotografia do sistema em papel. Adaptado de [64].

Para finalizar este subcapítulo são destacadas duas áreas que se encontram muito em voga nos dias atuais, nomeadamente monitorização ambiental e bioterrorismo. Inúmeros avanços têm vindo a ser desenvolvidos em ambas as áreas. Kim *et al.* criaram um método microfluídico capaz de identificar possíveis bactérias patogénicas como a *escherichia coli* (*e.coli*) na água. Este método de análise emprega uma aplicação móvel (Figura 2.12), podendo assim ser utilizado em qualquer local [67].



**Figura 2.12:** Dispositivo utilizado para a detecção de *e.coli* na água através de uma aplicação num telemóvel. Adaptado de [67].

Outro sistema desenvolvido por Saito *et al.* permite a identificação de potenciais agentes químicos e biológicos nocivos à saúde. O kit (Figura 2.13) demonstra a versatilidade e a multitude de funções capazes de serem executados por esta tecnologia utilizando vários métodos de deteção [71]. A partir de uma amostra de ar é capaz de identificar gases que afetam o sistema nervoso como o caso do gás sarin. Além disso, através de um sensor eletroquímico consegue medir a atividade da acetilcolina (neurotransmissor importante na contração muscular). É ainda capaz de identificar proteínas tóxicas capazes de despoletar doenças infecciosas através de um sensor que executa a técnica analítica ressonância plasmônica de superfície. Oferece ainda a disponibilidade de identificar agentes patogénicos como o antraz através de um biossensor capaz de amplificar a cadeia de ADN.



**Figura 3.13:** Dispositivo capaz de identificar possíveis ataques químicos e patogênicos: a) detecção de gases que afetam o sistema nervoso; b) detecção de toxinas que possam potencializar uma doença infecciosa; c) identificação de agentes patogênicos. Adaptado de [71].

Pelo exposto anteriormente, é possível confirmar o potencial que a tecnologia microfluidica tem nas mais diversas áreas (bio)tecnológicas. Contudo, ainda muitas limitações devem ser colmatadas num futuro próximo de forma aumentar a taxa de comercialização dos sistemas desenvolvidos, que ainda se encontra muito reduzida. Com este trabalho, pretende-se dar um impulso neste sentido com o desenvolvimento e validação de novos substratos microfluídicos baseado em polímeros piezoelétricos, como materiais complementares ao papel, muito utilizado na quantificação e monitorização de entidades biológicas e químicas.





### **3. Materiais e métodos**



### **3.1. Introdução**

A atividade experimental do presente trabalho dividiu-se em várias etapas onde materiais poliméricos baseados em PLLA e PVDF foram processados por diferentes técnicas de fabrico com o intuito de obter-se substratos microfluídicos com morfologias distintas. No caso do PLLA, substratos constituídos por fibras não orientadas e orientadas foram obtidos por eletrofiação. Além disso substratos com morfologia porosa de PLLA foram processados por separação de fase induzida por temperatura. Num estudo complementar e devido a elevada resposta piezoelétrica, substratos de morfologia porosa de PVDF, P(VDF-TrFE), P(VDF-CTFE) e P(VDF-HFP) foram igualmente processados por separação de fase induzida por temperatura. A adição de zeólitos hidrofílicos na matriz polimérica assim como tratamentos de plasma foram testados numa tentativa de reduzir a elevada hidrofobicidade apresentada por estes polímeros. Além de toda a caracterização físico-química, ensaios de capilaridade foram realizados de forma a determinar o fluxo de fluido nos substratos processados. Por fim, como prova de conceito, canais microfluídicos foram impressos com recurso a impressora a cera e avaliados.

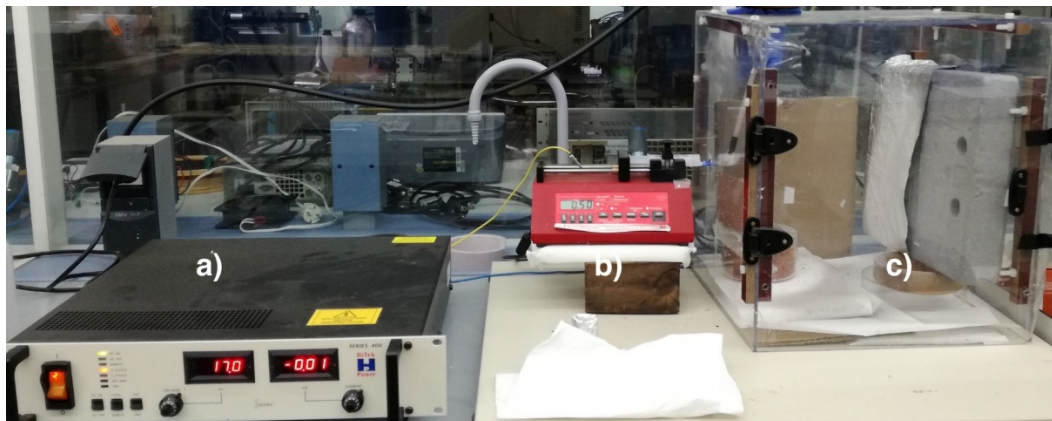
### **3.2. Materiais**

PLLA Purasorb PL18 com um peso molecular de 217.000-25.000 g.mol<sup>-1</sup> foi adquirido na *Purac*. PVDF 6010, P(VDF-TrFE) 70/30 (70 mol% monómero fluoreto de vinilideno; 30 mol% trifluoroetileno), P(VDF-HFP) Solef 21216 e P(VDF-CTFE) Solef 31508 foram adquiridos na *Solvay*. Zeólitos NaY (CBV 100) foram obtidos na Zeolyste Internacional. N,N-dimetilformamida (DMF) e diclorometano (MC) foram adquiridos na Sigma-Aldrich. Água desionizada foi preparada no laboratório. Todos os produtos químicos e solventes foram usados como recebidos.

### **3.3. Processamento de substratos de poli(L-ácido láctico) constituídos por fibras**

Os substratos de PLLA constituídos por fibras foram processados por eletrofiação. Nesta técnica, a solução polimérica é eletricamente carregada através da aplicação de uma voltagem, até que uma fibra seja produzida por forças electroestáticas. Os componentes utilizados para o

procedimento experimental são um capilar, normalmente uma seringa, onde se encontra a solução polimérica. Uma fonte de alimentação é necessária para gerar um potencial elétrico, assim como um coletor onde se irão depositar as fibras (Figura 3.1) [72].



**Figura 3.1:** Equipamento utilizado para o desenvolvimento da técnica de eletrofiação destacando-se a) fonte de elétrica; b) Bomba de fluxo; c) coletor estático.

Em relação ao processo físico-químico propriamente dito, este baseia-se na aplicação de uma tensão elétrica na solução que irá gerar forças eletrostáticas, como previamente descrito. Quando a voltagem for suficiente para que as forças electroestáticas criadas sejam superiores à tensão superficial (força gerada entre as moléculas com cargas opostas), a solução será libertada sob a forma de um jato carregado eletricamente. Este realizará movimentos de estiramento e de oscilação formando o cone de Taylor e fazendo com que o solvente seja evaporado e o fluido seja coletado sob a forma de fibras. [73]. Dois tipos de coletores foram utilizados neste trabalho: um estático para a obtenção de fibras não orientadas e um rotativo para a obtenção de fibras orientadas [74]. Diversos parâmetros podem influenciar o tipo de morfologia das fibras produzidas, podendo os mesmos serem agrupados em três grandes grupos: os parâmetros da solução, os parâmetros de processamento e os parâmetros ambientais (Tabela 3.1).

**Tabela 3.1:** Efeito de parâmetros de processamento de fibras por eletrofiação.

Parâmetros		Efeitos na morfologia da fibra	Referência
Parâmetros da solução	Viscosidade	Aumento do diâmetro da fibra com o aumento da viscosidade	[75]
	Concentração do polímero	Aumento do diâmetro da fibra com o aumento da concentração do polímero	[76]
	Peso molecular do polímero	Redução do número de gotas com o aumento do peso molecular	[77]
	Condutividade	Diminuição do diâmetro das fibras com o aumento da condutividade	[77]
	Tensão superficial	Elevada tensão provoca instabilidade no jato	[78]
Parâmetros de Processamento	Tensão aplicada	Diminuição do diâmetro da fibra com aumento da tensão aplicada	[76]
	Distância ao coletor	Diminuição do diâmetro da fibra com aumento da distância	[79]
	Taxa de Fluxo	Aumento do diâmetro das fibras com o aumento da taxa de fluxo	[79]
Parâmetros ambientais	Humidade	Elevada humidade resulta em poros circulares nas fibras	[80]
	Temperatura	Aumento da temperatura resulta na diminuição do tamanho das fibras	[80]

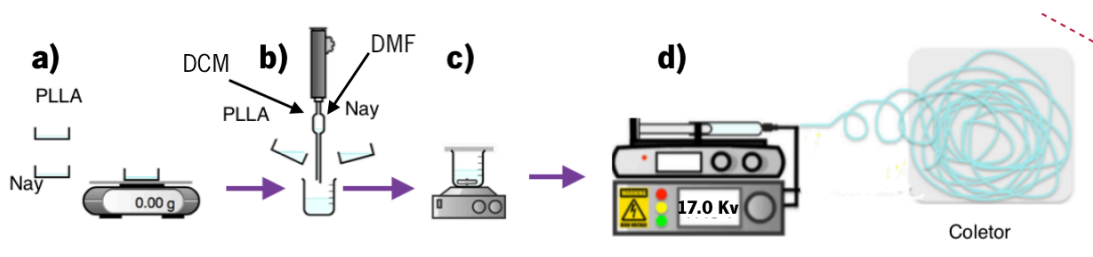
No âmbito deste trabalho, os parâmetros utilizados foram ajustados tendo em conta trabalhos anteriores [54, 55, 81] de forma a obter fibras contínuas sem aglomerados.

### 3.3.1. Fibras de poli(L-ácido láctico) não orientadas

O primeiro procedimento experimental executado foi a produção de fibras de PLLA não orientadas numa tentativa de mimetizar a estrutura do papel de filtro *Whatman n°1* muito usado no fabrico de sistemas microfluídicos [37], sendo o mesmo constituído por fibras não orientadas achatadas. No entanto, contrariamente ao papel que é hidrofílico, o PLLA é hidrofóbico impossibilitando a sua aplicação direta como substrato microfluídico. Consequentemente, numa tentativa de reduzir a hidrofobicidade deste polímero, zeólitos NaY foram adicionados a matriz polimérica com concentrações de 0, 5, 10 e 20 % peso/peso. Os zeólitos têm uma estrutura tridimensional com poros. Todos os zeólitos naturais contêm alumínio e são hidrofílicos, sendo assim bons absorventes para substâncias polares. Este tipo de zeólitos em particular já provou ser eficiente em várias aplicações, [55, 82] incluindo no fabrico de membranas de filtração, justificando a sua escolha neste trabalho. Além disso, tratamento de plasma de oxigénio e plasma de argon foram

efetuados de forma a verificar igualmente o seu efeito na diminuição da hidrofobicidade de superfície do PLLA.

No que diz respeito ao processo de eletrofiação propriamente dito, ilustrado na Figura 3.2, uma solução de 10% em volume de PLLA em DCM/DMF (70/30) foi preparada sob agitação magnética (IKA C-MAG HS7) à temperatura ambiente, até total dissolução do polímero. No caso da preparação de soluções poliméricas com zeólitos, NaY com concentração pretendida (percentagem em massa em relação ao polímero) foi disperso nos solventes em banho de ultrassons durante 1 h, seguindo-se a adição e dissolução do polímero por agitação magnética. Para cada solução obtida procedeu-se então ao processamento de fibras não orientadas por eletrofiação. A solução foi então colocada no interior de uma seringa (10 mL) com uma agulha com 0.5 mm de diâmetro interno. Esta por sua vez foi introduzida numa bomba de fluxo (da *Syringepump*) com uma taxa de  $0.5 \text{ mL.h}^{-1}$  e o processo de eletrofiação foi conduzida a 17 kV com recurso a uma fonte de alimentação de alta tensão (da *Glassman* modelo *PS7FC30P04*). As fibras não orientadas foram coletadas numa folha de alumínio (Figura 3.3a).



**Figura 3.2:** Representação esquemática da produção de fibras de PLLA não orientadas a) pesagem do polímero b) adição dos solventes, c) dissolução do polímero sobre agitação magnética d) processo de eletrofiação. No caso da adição de zeólitos, os mesmos foram previamente dispersos nos solventes antes da adição do PLLA.

### 3.3.2. Fibras de poli(L-ácido láctico) orientadas

Adicionalmente, substratos de PLLA com fibras orientadas foram processadas com o objetivo de aumentar o leque de estruturas apresentadas pelos substratos de papel comerciais, assim como estudar a influência da orientação das fibras no fluxo de fluídos que serão realizados nos testes de capilaridade.

Os procedimentos laboratoriais para a obtenção de fibras de PLLA orientadas são de todo iguais ao descritos na secção 3.3.1, à exceção do coletor que é rotativo (Figura 3.3b) em vez de ser

estático (Figura 3.3a). Deste modo, de forma obter fibras orientadas, o coletor rotativo produz 1500 rpm.

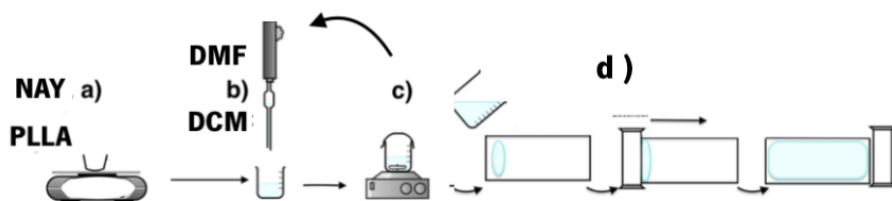


**Figura 3.3:** Coletores utilizados na técnica de eletrospinação: a) coletor estático; b) coletor rotativo.

### **3.4. Processamento de filmes de poli(L-ácido láctico) com estrutura porosa**

Como descrito na secção 2.2.3, diferentes papeis podem ser encontrados comercialmente e utilizados como substratos para microfluidica, diferenciando nas suas propriedades e morfologias. Os substratos da gama *Hi-Flow Plus Membranes* da *Millipore* apresenta grande potencial no fabrico de sistemas microfluídicos por apresentar uma estrutura porosa (ao contrário dos papeis de filtro *Whatman*) com tamanho de poros controlado, permitindo assim controlar a filtragem de entidades de acordo com o seu tamanho assim como a velocidade do fluxo de fluidos. Consequentemente, surgiu o interesse de se produzir substratos de PLLA com estrutura porosa, utilizando para tal a técnica de separação de fase induzida por temperatura. Esta técnica permite a produção de filmes porosos, sendo que a estrutura porosa pode ser prevista pelo diagrama de fases do sistema polímero/solvente, no qual estão identificadas as regiões de miscibilidade e separação de fases. Além disso, a temperatura de processamento afeta o grau de porosidade e o tamanho de poro [83].

Neste caso, dois tipos de substratos porosos de PLLA foram produzidos: um sem zeólitos e outra com uma concentração de zeólitos de 10 %. O procedimento para a preparação da solução de PLLA sem e com zeólitos NaY foi a mesma que a descrita na secção 3.3.1. Após obtenção das soluções, as mesmas foram vertidas num substrato de vidro previamente limpo e um extensor com uma abertura de 700  $\mu\text{m}$  foi utilizado de forma a espalhar a solução e obter filmes uniformes. Por fim, os filmes foram deixados a temperatura ambiente ( $\approx 25^{\circ}\text{C}$ ) até total evaporação do solvente (Figura 3.4).



**Figura 3.4:** Representação esquemática da produção de filmes porosos de PLLA sem zeólitos: a) pesagem do PLLA; b) adição dos solventes; c) dissolução do PLLA por agitação magnética; d) deposição da solução com recurso a um extensor e evaporação a temperatura ambiente. No caso da adição de zeólitos, os mesmos foram previamente dispersos nos solventes antes da adição do PLLA.

### 3.5. Processamento de substratos baseados em poli(fluoreto de vinilideno) com estrutura porosa

Como estudo complementar ao PLLA, filmes porosos baseados em PVDF foram produzidos pela técnica de separação de fase induzida por temperatura. Embora não sejam biodegradáveis como o PLLA, o PVDF e seus copolímeros apresentam respostas piezoelétricas superiores, podendo ser relevante futuramente como substratos ativos para microfluídica.

Primeiramente, filmes porosos de PVDF, P(VDF-TrFE), P(VDF-CTFE) e P(VDF-HFP) foram produzidos sem adição de zeólitos. Este estudo inicial teve como objetivo escolher aquele que apresenta morfologia mais interessante para sistemas microfluídicos e igualmente mais homogênea. De facto, a técnica utilizada para processamento leva a que a taxa de evaporação de solvente seja mais rápida na superfície do polímero em contacto com o ar do que a superfície em contacto com o vidro, podendo levar a obtenção de estruturas heterogêneas.

Deste modo, o procedimento experimental passou por dissolver concentrações predefinidas de (co)polímero em DMF com recurso a agitação magnética. Uma temperatura de 30 °C foi aplicada durante os primeiros 15 min de forma a evitar a formação de agregados e assim acelerar o processo de dissolução. As concentrações utilizadas foram de 14, 14, 13 e 7 % em volume para o PVDF, P(VDF-TrFE), P(VDF-CTFE) e P(VDF-HFP), respetivamente, e foram definidas de acordo com estudos prévios publicados na literatura [84-87]. De seguida, as soluções foram espalhadas em substratos de vidro com recurso a um extensor com abertura de 700 µm. Estas aberturas foram escolhidas por permitir obter filmes porosos com espessura adequada para impressão de canais hidrofóbicos por impressão a cera, usado no desenvolvimento de sistemas microfluídicos

em papel. Por fim os filmes foram deixados a temperatura ambiente ( $\approx 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) até total evaporação do solvente.

Tendo-se verificado que o filmes porosos de P(VDF-CTFE) eram aqueles que apresentavam morfologias mais interessantes, propriedades mecânicas adequadas e estrutura porosa homogênea, o segundo estudo passou por adicionar 10 % em massa de zeólito NaY. O procedimento relativo a adição do zeólito é similar aos descritos anteriormente.

### **3.6. Tratamento de plasma**

Como já exposto anteriormente, uma grande limitação adjacente aos polímeros piezoelétricos baseados no PLLA e PVDF para aplicação como substratos microfluídicos complementares ao papel advém da sua elevada hidrofobicidade. Tendo-se verificado que a adição de zeólitos na matriz polimérica não tinha qualquer efeito na alteração da hidrofobicidade dos substratos obtidos (como será abordado no capítulo 4), realizou-se tratamentos de plasma as amostras, técnica comumente utilizada para alterar a hidrofobicidade de superfície de polímeros [55]. De facto, o tratamento com plasma pode ser utilizado para adaptar as propriedades de aderência e molhabilidade da superfície dos polímeros, alterando a composição química de superfície através de ambientes químicos reativos onde diferentes reações na interface superfície/plasma ocorrem [88]. Neste sentido, tratamentos com plasma permitem introduzir grupos funcionais, controlar ligações cruzadas e rugosidade de superfície, aumentar a adesão de filmes finos, entre outros. O sucesso do tratamento de plasma está associado a seleção da fonte de plasma (oxigénio, argon, nitrogénio, entre outros), tempo de tratamento e potência. O oxigénio é um dos elementos mais reativos e pode gerar grupos carboxilos na superfície de polímeros devido a incorporação de grupos funcionais hidrofílicos. O argon, por sua vez, tem tendência a levar a alterações relevantes da morfologia de superfície [89, 90].

Consequentemente, tratamentos de plasma com gases de argon (Ar) e de oxigénio ( $\text{O}_2$ ) foram realizados em todas as amostras anteriormente processadas e o seu efeito na hidrofobicidade de superfície avaliado. O tratamento com oxigénio foi realizado posteriormente a caracterização das amostras submetidas a tratamento com argon por se ter verificado que este último não tinha efeito nos filmes porosos baseados PVDF. Embora seja de conhecimento científico que o tratamento de

plasma com oxigênio torna filmes de PVDF citotóxicos, este efeito pode ser colmatado num trabalho futuro através do revestimento das amostras com polímero hidrofílico e biocompatível. Os tratamentos foram realizados numa câmara de plasma (*Electronic Diener Plasma-Surface-Technology* da *Zepto*) equipado com um gerador de plasma de radiofrequência de 40 kHz, (Figura 3.5). A pressão base do sistema (obtida antes da ignição de plasma) foi de 20 Pa. Tratamentos de plasma foram conduzidos independentemente com argon e oxigênio como gases de trabalho, durante 10 min e com uma potência de plasma de 100 W sob uma pressão total de 80 Pa. Este procedimento foi realizado em ambas as superfícies dos substratos processados.



**Figura 3.5:** Fotografia da câmara de tratamento de plasma.



### 3.7. Resumo dos substratos baseados em poli(L-ácido láctico) e poli(fluoreto de vinilideno) processados

Na Tabela 3.2 estão sumarizadas as amostras processadas ao longo deste trabalho.

**Tabela 3.2:** Resumo dos substratos poliméricos processados no âmbito deste trabalho.

Polímero	Morfologia	% zeólitos NaY (em massa relativo ao polímero)
PLLA	Fibras não orientadas	0
		5
		10
		20
	Fibras orientadas	0
		5
		10
		20
	Filmes porosos	0
		10
PVDF	Filmes porosos	0
P(VDF-TrFE)		0
P(VDF-CTFE)		0
		10
PVDF-HFP		0

Todas as amostras foram recortadas de forma a serem caracterizadas antes do tratamento com plasma e quando submetidas a tratamento com plasma de oxigénio de com plasma de árgon.

### 3.8. Técnicas de caracterização

#### 3.8.1. Microscopia eletrónica de varrimento

Com o objetivo de analisar e comparar a morfologia estrutural dos materiais produzidos, recorreu-se à técnica de microscopia eletrónica de varrimento (SEM do inglês *scanning electron microscope*). Esta permite a obtenção de uma imagem tridimensional com elevada resolução de diferentes materiais desde a escala micro- à nanométrica, ao nível de topografia de superfície, microestrutura, cristalografia, composição química, entre outras [91].

No que diz respeito ao modo de funcionamento propriamente dito, a aplicação de um feixe de eletrões na superfície da amostra faz que os átomos presentes à superfície adquiram energia

suficiente para que os eletrões sejam emitidos para a banda de valência. Fruto da morfologia da superfície estes últimos são emitidos com diferentes intensidades produzindo diferentes sinais que são recolhidos por um detetor. Estes sinais são então convertidos digitalmente em informação e produzem uma imagem tridimensional [92]. Destes destacam-se os eletrões secundários e os retrodifundidos que permitem produzir imagens com melhor resolução resultante da sua proximidade com o detetor. Os primeiros são utilizados para fornecer informações ao nível da morfologia e topografia da amostra. Os retrodifundidos permitem uma melhor visualização de contrastes em amostras multifásicas, permitindo uma rápida discriminação das diferentes fases [92].

Antes da análise por SEM, as amostras foram revestidas com uma fina camada de material condutor, nomeadamente ouro, pela técnica de pulverização catódica (*Polaron SC502*) de forma a garantir uma boa produção de eletrões secundários [92, 93]. De seguida, as amostras foram analisadas recorrendo a um microscópio *Polaron SC502* com uma voltagem de 3 kV.

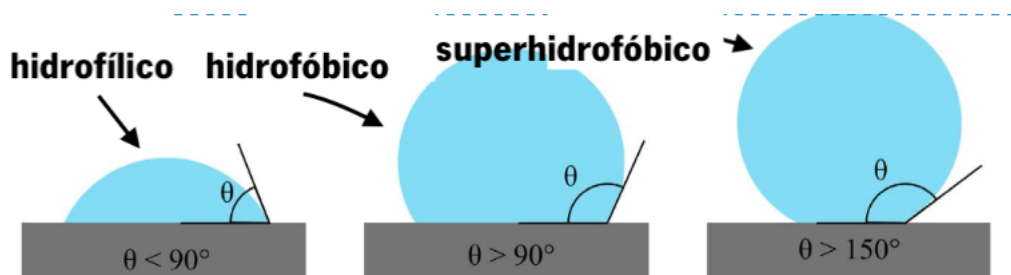
### **3.8.2. Ângulo de contacto**

De forma a avaliar a influência dos zeólitos e dos tratamentos de plasma na hidrofobicidade de superfície das amostras processamentos, realizou-se medições de ângulos de contacto.

Esta caracteriza-se pela colocação de uma gota séssil na superfície da amostra formando um ângulo que será medido e que de acordo com uma série de valores padrão é usado para determinar a molhabilidade da amostra [94]. Por outras palavras, o ângulo de contacto é compreendido como o comportamento que uma gota séssil tem numa superfície sólida em contacto com o ar. O aparelho de medição consiste numa câmara, uma seringa, um dispensador, uma lâmpada e uma plataforma móvel. No interior da seringa coloca-se um determinado volume de água ultrapura que normalmente se situa nos 500  $\mu\text{L}$ . A seringa é colocada sob a ação de um dispensador que faz com que seja libertada sempre a mesma quantidade de volume. A gota é então depositada sobre a superfície da amostra. Uma determinada luz incide sobre a gota para que a câmara presente no dispositivo capte uma imagem da interface entre a gota e o material. O goniómetro telescópio encontra-se ligado ao computador fornecendo a informação analítica do ângulo de contacto [94].

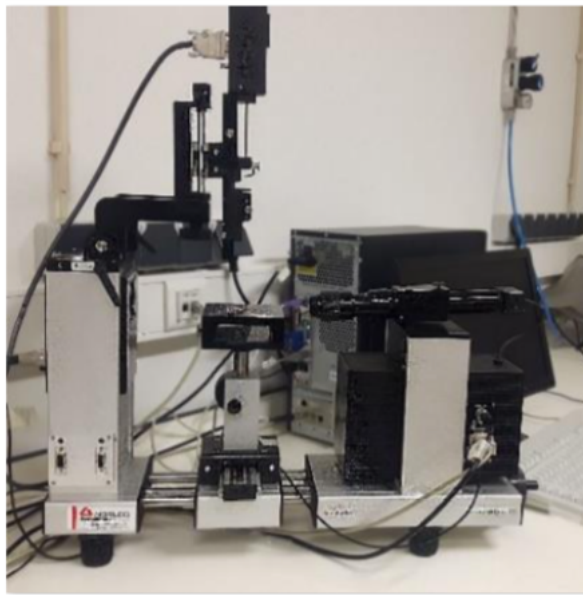
Define-se um material superhidrofóbico quando os valores do ângulo de contacto são superiores a  $150^\circ$ . Para materiais hidrofóbicos os valores compreendem-se entre  $90^\circ$  e os  $150^\circ$ . Quando os

valores são inferiores a  $90^\circ$  a amostra é considerada hidrofílica (Figura 3.6). Por último quando o ângulo é inferior a  $10^\circ$  diz-se superhidrofílica [95].



**Figura 3.6:** Representação esquemática dos diferentes graus de interação de uma gota com uma superfície, caracterizada pelo ângulo de contacto. Adaptada de [96].

A medição de ângulos de contacto foi realizada com recurso a um *OCA15 Dataphysics contact angle analyser* (Figura 3.7). Para a formação da gota foi utilizada uma agulha Hamilton de 500  $\mu\text{L}$ . 3  $\mu\text{L}$  de água ultrapura foi depositada na amostra a uma velocidade de 2  $\mu\text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ , e a medição do ângulo de contacto foi realizada com o programa SCA20 versão 2. Um total de 10 medições em diferentes partes de cada amostra foi realizada, sendo os resultados apresentados como uma média e desvio padrão.



**Figura 3.7:** Equipamento utilizado para medição do ângulo de contacto.

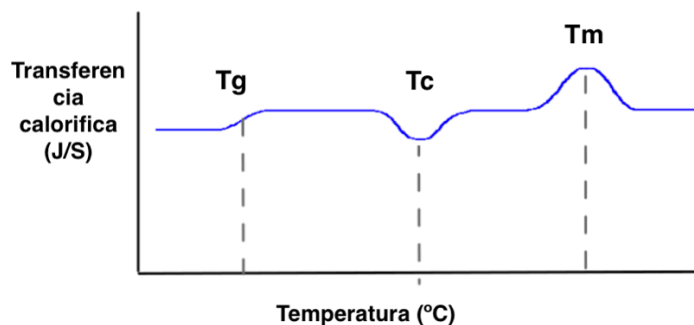
### 3.8.3. Espectroscopia de infravermelhos com transformadas de Fourier

A espectroscopia de infravermelhos com transformadas de Fourier (FTIR) é uma técnica de análise utilizada para caracterizar a estrutura química de um material através da vibração dos átomos presentes neste. O princípio de funcionamento da técnica baseia-se na incidência de uma luz na gama dos infravermelhos ( $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ ) no material em estudo. Quando esta incide, parte é absorvida pelas moléculas a diferentes comprimentos de onda e outra parte é transmitida dando origem a um espectro. Neste identificam-se diferentes picos de absorção, que correspondem a diferentes frequências de vibração entre as ligações dos átomos que formam o material. Para que estas surjam é preciso que a molécula sofra uma variação no seu momento dipolar. Uma vez que os grupos funcionais possuem níveis de energia bem definidos pode determinar-se a composição química, ou alterações da mesma, através da comparação dos picos do espectro de absorção com uma base de dados [97].

No presente trabalho, o instrumento de análise utilizado foi um espectrofotómetro *Spectrum Two™* da *Perkin-Elmer*, constituído de um sistema de reflexão total atenuada (ATR do inglês *attenuated total reflection*). Os espectros de FTIR-ATR foram obtidos num intervalo compreendido entre os  $600$  e  $4000\text{ cm}^{-1}$  com uma resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$  e 64 varrimentos por amostra. Com esta técnica será possível estudar a influência dos zeólitos e tratamentos de plasma nas amostras processadas.

### 3.8.4. Calorimetria diferencial de varrimento

A calorimetria diferencial de varrimento (DSC do inglês *differential scanning calorimetry*) é uma das técnicas mais utilizada para se estudar a resposta que os polímeros têm quando são sujeitos a alterações de temperatura [98]. O método de funcionamento baseia-se num registo do fluxo calorífico, que se associa às diferentes transições de fase, em relação a uma câmara de referência vazia. O que o sistema faz é medir a quantidade de calor absorvido (processo endotérmico) ou irradiado (processo exotérmico) em comparação à referência quando ambas são submetidas ao mesmo sistema de aquecimento e de arrefecimento. Através do uso desta técnica é possível determinar diferentes fases do polímero como são a transição vítrea ( $T_g$ ), a temperatura de cristalização ( $T_c$ ) e a temperatura de fusão ( $T_m$ ). Num termograma de DSC, exemplificado na Figura 3.8, é possível identificar perfeitamente estas fases. Na temperatura de transição vítrea verifica-se um pico endotérmico ao passo que um pico exotérmico é obtido na temperatura de fusão [99]. O cálculo da quantidade de energia calorífica que é necessário para que as cadeias do polímero fundão ou cristalizem podendo ser obtidas através das áreas das curvas do termograma.



**Figura 3.8:** Termograma com as diferentes transições de temperatura. Adaptada de [98].

Para além das diferentes fases de transição de estado, é possível calcular o grau de cristalinidade através dos termogramas. Com recurso a Equação 3.1 é possível calcular a percentagem de cristalinidade de uma amostra de PLLA [100].

$$\Delta X_c = \frac{\Delta H_m - \Delta H_{cc}}{\Delta H_m^0} \quad \text{Equação 3.1}$$

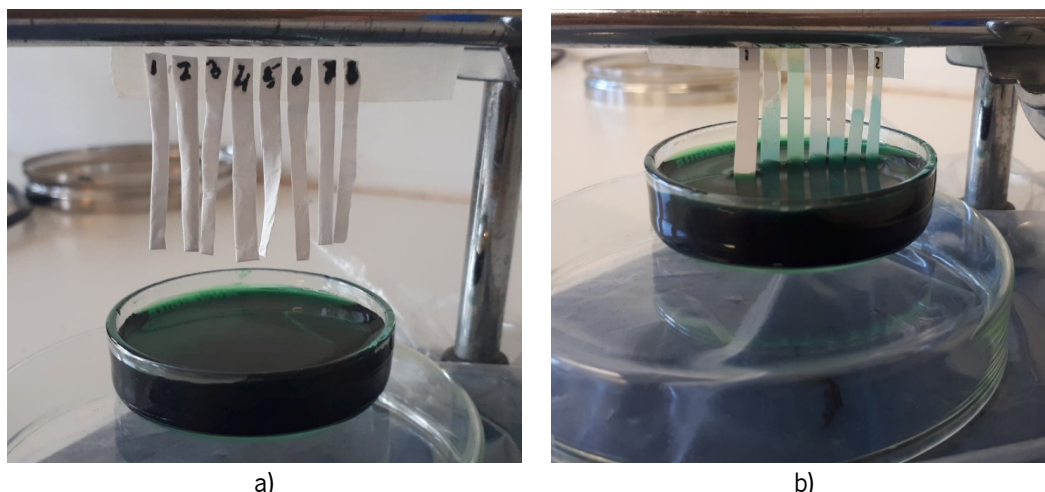
sendo que  $\Delta X_c$  é a percentagem de cristalinidade (%),  $\Delta H_m$  é a entalpia de fusão e  $\Delta H_{cc}$  é a entalpia de cristalização.  $\Delta H_m^0$  é a entalpia de fusão quando o polímero é 100% cristalino, tendo um valor teórico de 93,1 J.g<sup>-1</sup> no caso do PLLA.

Amostras com aproximadamente 6 mg foram recortadas e analisadas individualmente pelo sistema DSC (*DSC 832* da *Mettler Toledo*), que operou com um fluxo de calor de 10 °C.min<sup>-1</sup>, num intervalo de temperatura entre 40 e 200 °C. Para aquisição de dados utilizou-se o software *Mettler Toledo STAR*.

### 3.8.5. Ensaio de capilaridade

Ensaio de capilaridade foram realizadas em todas as amostras sem e com tratamento de plasma. Trata-se de uma técnica comumente utilizada de forma a determinar o fluxo de fluídos em substratos microfluídicos como o papel. Para tal amostras com 2.5 cm de altura e 1 cm de largura foram recortadas e colocadas verticalmente em contacto com uma solução contendo um corante alimentar (Figura 3.9). A porção de amostra imersa na solução foi de 0.5 cm e determinou-se o

tempo que o corante demora a percorrer toda a amostra, no sentido "antigravitacional". Estes ensaios são decisivos de forma a verificar o real efeito que a morfologia da amostra, a presença ou ausência de uma concentração de zeólitos e os tratamentos de plasma têm no fluxo de fluidos e consequentemente na aplicabilidade destes substratos em microfluídica [101]. De facto, uma das propriedades que torna um substrato de papel interessante, e consequentemente qualquer outro substrato desenvolvido para o mesmo efeito, é de facto o seu efeito capilar e a possibilidade de gerar fluxos passivamente [102].

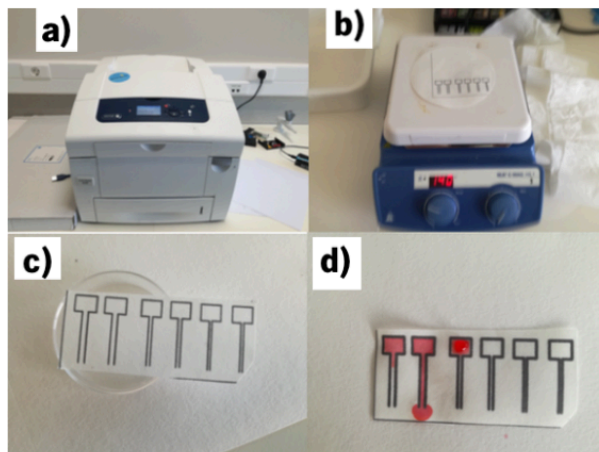


**Figura 3.9:** Fotografia de um ensaio de capilaridade em que amostras de substratos recortadas são imergidas num corante alimentar: a) antes da imersão; b) após imersão onde ocorre fluxo do corante.

### 3.8.6. Prova de conceito

Para finalizar este trabalho, os substratos desenvolvidos e que apresentam propriedades adequadas foram testados para microfluídica através da impressão de barreiras hidrofóbicas com recurso a uma impressão a cera, comumente utilizada nos substratos de papel. Para tal, primeiro desenhou-se microcanais com recurso a um programa DAC e imprimiu-se os mesmos em cada substrato através de uma impressora *Xerox Colorcube 8580* (Figura 3.10a). As barreiras em cera apresentam uma largura de 300  $\mu\text{m}$  e o canal com uma largura de 1 mm e um comprimento de 3 cm. Além disso o canal compreende um reservatório onde são colocados os fluidos, que irão fluir no canal por capilaridade. De seguida, as amostras foram colocadas numa placa de aquecimento a 60  $^{\circ}\text{C}$  durante 10 min para que a cera penetra toda a secção transversal e assim cria barreiras hidrofóbica que irão conter o fluido (Figura 3.10b). Esta temperatura é inferior a utilizada no caso do papel (100  $^{\circ}\text{C}$  durante 2 min) de forma a manter a integridade das amostras de PLLA que sofram deformações quando sujeitas a temperaturas mais elevadas. Por fim, as

amostras foram deixadas em repouso cerca de 10 min (Figura 3.10c) e 40  $\mu\text{L}$  de corante alimentar dissolvido em água sendo colocada no reservatório de entrada do canal com ajuda de uma micropipeta (Figura 3.10d). O fluxo por capilaridade do fluido foi então determinado, contabilizando o tempo que o corante demora a percorrer o canal.



**Figura 3.10:** Fotografias do procedimento experimental para testar os substratos desenvolvidos para microfluidica: a) impressora a cera; b) aquecimento dos canais impressos; c) canais impressos; d) ensaios de capilaridade.







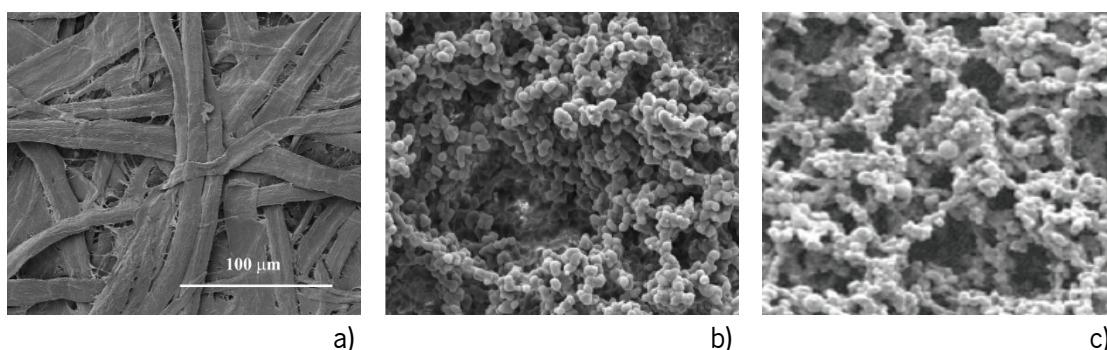
## **4. Resultados e discussão**

## 4.1. Introdução

No presente capítulo serão apresentados e descritos todos os resultados experimentais obtidos no decorrer deste trabalho. Como referência, imagens SEM de substratos comerciais comumente utilizado para o fabrico de sistema microfluídico serão apresentados. De seguida, e de forma a simplificar a apresentação e compreensão dos resultados, os mesmos serão abordados por tipo de polímero e morfologia processados. Em cada um deles, uma análise estrutural e morfológica, uma análise da hidrofobicidade de superfície, uma análise das propriedades físico-químicas assim como um estudo de capilaridade serão apresentados. Por fim um estudo comparativo entre os vários substratos será realizado, finalizando com uma prova de conceito onde canais microfluídicos foram impressos por impressão a cera e testados.

## 4.2. Substratos comerciais

Na Figura 4.1 estão apresentadas imagens SEM representativas de três substratos comercialmente disponíveis para o fabrico de sistemas microfluídicos. As imagens dos substratos *Millipore* foram obtidas na brochura *Hi-FlowPlus* da *Millipore*.



**Figura 4.1:** Imagens SEM de substratos comerciais: a) *Whatman no. 1*; b) *HF075* da *Millipore* (High Flow Plus); c) *HF180* da *Millipore*. (High Flow Plus) (escala não fornecida na brochura) .

É possível verificar que os substratos *Whatman* e *Millipore* apresentam morfologias distintas. Enquanto o papel *Whaman no. 1* (Figura 4.1a) apresenta uma morfologia em fibras não orientadas e aparentemente achatadas, os substratos da *Millipore HF075* e *HF180* (Figuras 4.1b e 4.1c, respetivamente) apresentem uma estrutura porosa constituídas. No caso dos substratos *Millipore*, os fluxos capilares referidos na brochura são de  $\approx 32 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$  e  $\approx 13 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$  para o *HF075* e

*HF180*, respetivamente. Ensaio realizado no laboratório de acordo com a técnica de caracterização descrita na secção 3.8.5. deram valores de fluxo capilar de  $\approx 44$  e  $\approx 12$  mm.min<sup>-1</sup> para o *Whatman no.1* e o *HF090*, respetivamente. O valor obtido para o *HF090* é muito inferior ao referido na brochura ( $\approx 27$  mm.min<sup>-1</sup>) e poderá dever-se ao facto de os ensaios de capilaridade terem sido realizados no sentido "antigravitacional" e não horizontalmente.

Pelo controlo do tamanho de poros dos substratos da *Millipore*, os mesmos podem ser utilizados igualmente como membranas de filtração, sendo que o *HF180* filtra entidades com diâmetro igual ou superior a  $\approx 400$   $\mu$ m.

A realização deste pequeno estudo foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho, nomeadamente para a escolha dos materiais e técnicas de fabrico.

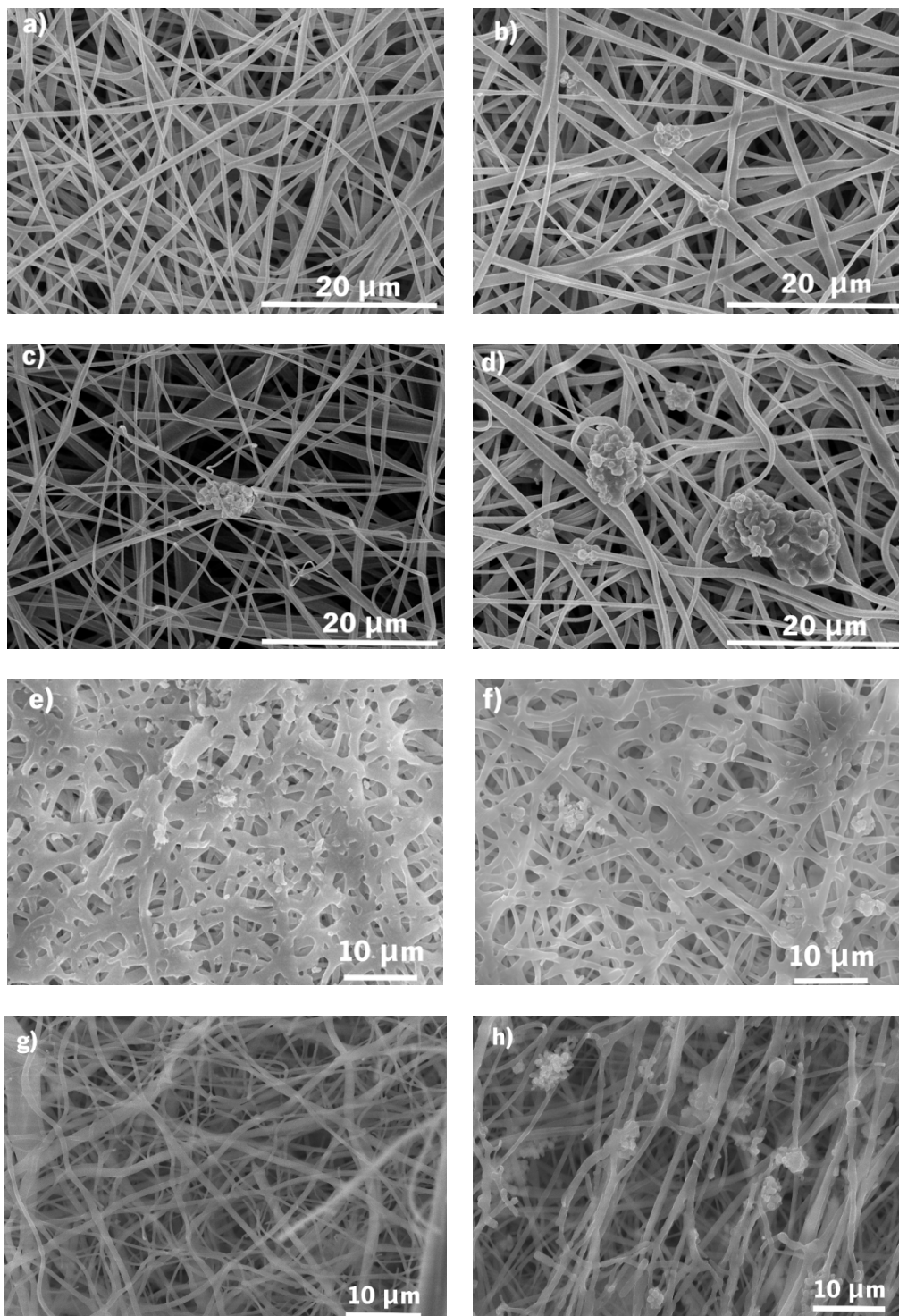
#### **4.3. Substratos de poli(L-ácido láctico)**

De seguida serão apresentados e discutidos os resultados obtidos para os substratos de PLLA processamentos por eletrofiação para a obtenção de fibras não orientadas e orientadas, assim como por separação de fase induzida por temperatura para a obtenção de filmes porosos. A influência da adição de zeólitos NaY como de tratamentos de plasma com árgon e com oxigénio na morfologia, propriedades físico-químicas e capilaridade serão igualmente apresentados.

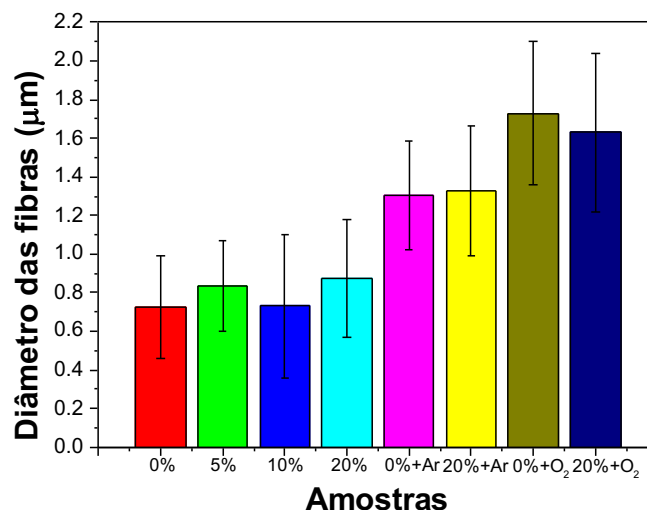
##### **4.3.1. Fibras de poli(L-ácido láctico) não orientadas**

###### **4.3.1.1. Análise estrutural e morfológica**

A técnica SEM foi utilizada para a visualização e análise da morfologia das amostras processadas (Figura 4.2). Recorrendo a um programa de análise de imagem *ImageJ* foram determinadas as distribuições de tamanho do diâmetro das fibras (Figura 4.3). No caso das amostras com tratamento de plasma, apenas os substratos de PLLA de fibras não orientadas com 0 e 20 % de zeólitos serão apresentadas, como representativas das restantes.



**Figura 4.2:** Imagens SEM representativas dos substratos de PLLA com fibras não orientadas com: a) 0 % NaY; b) 5 % NaY; c) 10 % NaY; d) 20 % NaY; e) 0 % NaY com tratamento de plasma com árgon; f) 20 % NaY com tratamento de plasma com árgon; g) 0 % NaY com tratamento de plasma com oxigénio; h) 20 % NaY com tratamento de plasma com oxigénio.



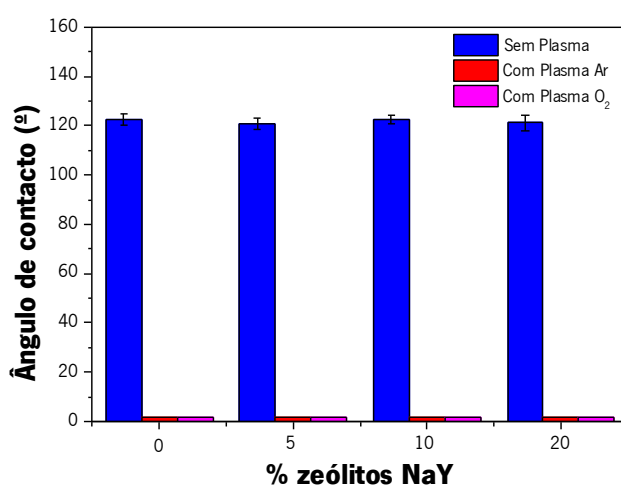
**Figura 4.3:** Distribuição de tamanho das fibras não orientadas com diferentes concentrações de zeólitos, sem e com tratamento com plasma de árgon (Ar) e com plasma de oxigénio (O<sub>2</sub>).

Analisando primeiramente os substratos de PLLA sem tratamento de plasma (Figura 4.2a-d) é possível observar que as mesmas apresentam fibras bem definidas e não orientadas, tal como esperado, com a presença de zeólitos confirmada nas amostras com 5, 10 e 20% de NaY. As mesmas não apresentam aglomerados (*beads*) permitindo concluir que os parâmetros de processamento foram adequados. Pela análise da distribuição de tamanho das fibras (Figura 4.3) é possível concluir que a adição de zeólitos não teve qualquer efeito nas mesmas, tendo-se obtidos valores de  $\approx 800$  nm. Em contrapartida, o pós-tratamento dos substratos com plasma de árgon teve um efeito significativo na morfologia, sendo que a estrutura fibrilar ficou comprometida. As mesmas apresentam-se maiores, com valor de  $\approx 1.4$  µm, fundidas e aparentemente mais achatadas. O facto dos substratos terem sido submetidos a tratamentos de plasma durante 10 min em cada superfície poderá ter levado ao sobreaquecimento das mesmas e consequente fusão das fibras, dando origem então a superfícies mais lisas. No entanto, é possível observar a presença de zeólitos nas amostras com 20 % e com tratamento de plasma de árgon. Relativamente as amostras submetidas a tratamentos de plasma de oxigénio, a estrutura fibrilar mantém-se particularmente inalterada com um aumento, contudo, significativo do tamanho das fibras. Embora estes tratamentos tiveram um efeito significativo na redução da hidrofobicidade de superfície das amostras, como será exposto posteriormente, uma otimização futura do tempo e potência do tratamento de plasma de árgon e oxigénio poderá ser uma mais valia de forma a balancear os

parâmetros de processamento de forma a manter o quanto possível a morfologia fibrilar e a hidrofilicidade de superfície [55].

#### 4.3.1.2. Análise da hidrofobicidade de superfície

Para avaliar de que forma a introdução dos zeólitos e a realização de tratamentos de plasma influenciou na hidrofobicidade superficial dos substratos de PLLA, medições de ângulo de contacto foram realizadas. Os resultados encontram-se apresentados na Figura 4.4.



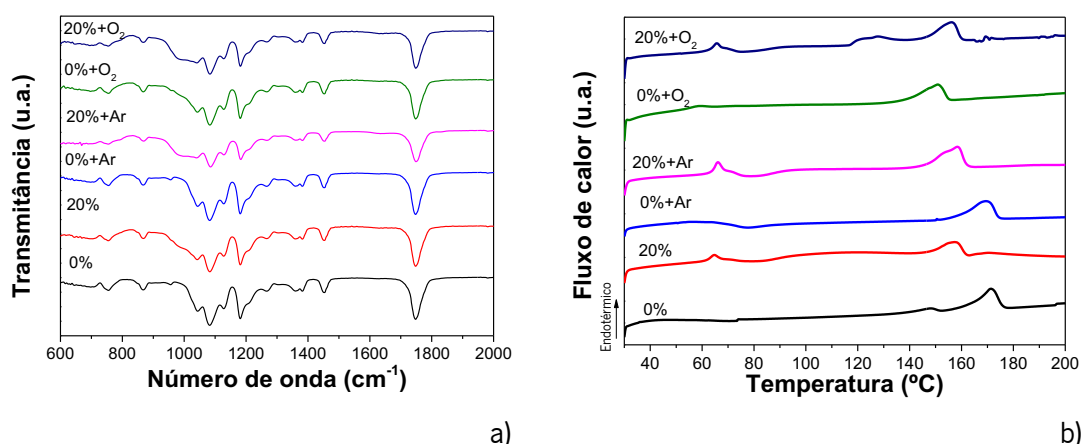
**Figura 4.4:** Ângulos de contacto das fibras de PLLA não orientadas com concentrações crescentes de zeólitos NaY (0%, 5%, 10% e 20%) sem e com tratamento de plasma de argon (Ar) e oxigénio (O<sub>2</sub>).

Fibras de PLLA são por natureza hidrofóbicas [51]. Consequentemente, os resultados obtidos para as fibras de PLLA sem zeólitos e sem tratamento de plasma estão de acordo com a literatura [103]. Contudo, contrariamente ao esperado, a adição de zeólitos NaY não teve qualquer efeito no ângulo de contato obtido, mantendo-se nos  $\approx 120^\circ$ . Seria de esperar que com o aumento da concentração de zeólito, a hidrofobicidade de superfície das fibras diminuísse de alguma forma. A explicação mais plausível para estes resultados é que os zeólitos tenham ficado revestidos com uma fina camada polimérica durante o processamento, anulando qualquer efeito que esses poderiam ter. Outra possível explicação advém do facto da rugosidade de superfície sobrepor-se ao efeito absorvente dos zeólitos. Com tratamentos de plasma com Ar e com O<sub>2</sub>, todas as amostras tornaram-se superhidrofílicas, não tendo sido possível a medição de qualquer ângulo de contacto

uma vez que a gota de água era imediatamente absorvida durante o ensaio. É de salientar que um valor próximo dos 0° foi dado para a formação do gráfico de forma a ser possível visualizar a alteração da molhabilidade. Deste modo, ambos os tratamentos com plasma se mostraram eficientes para promover uma alteração significativa da hidrofobicidade de superfície dos substratos, propriedade exigida para futura avaliação dos substratos para microfluídica.

#### 4.3.1.3. Análise das propriedades físico-químicas

Antes de determinar o fluxo por capilaridade obtido pela alteração da hidrofobicidade de superfície das fibras de PLLA não orientadas, uma avaliação da influência dos zeólitos e dos tratamentos de plasma nas propriedades químicas e térmicas dos materiais processados foi realizada. Consequentemente, os substratos de PLLA foram analisados por FTIR-ATR e por DSC, como apresentados nas Figuras 4.5a e 4.5b, respetivamente.



**Figura 4.5:** a) espectros de FTIR-ATR e b) curvas de DSC das fibras não orientadas com diferentes concentrações de zeólitos NaY, sem e com tratamento de plasma de árgon (Ar) e oxigénio (O<sub>2</sub>).

Como referido anteriormente, medidas de FTIR-ATR foram efetuadas de forma a avaliar as alterações químicas na cadeia polimérica das fibras de PLLA com a adição de zeólitos e após tratamentos com plasma de árgon e plasma de oxigénio. A estrutura química do PLLA é formada por unidades repetidas de -CH-C=O-O [104]. Como é possível observar não ocorre nenhuma variação notável dos espectros nas fibras com adição de zeólitos e após tratamento com plasma de árgon e plasma de oxigénio. Todas as amostras apresentam bandas de absorção aos 754 cm<sup>-1</sup> e aos 874 cm<sup>-1</sup>, ambas características do estiramento e rotação de CH<sub>3</sub>, e correspondentes à fase cristalina e à fase amorfa do polímero, respetivamente [105-107]. A banda de absorção aos 1044

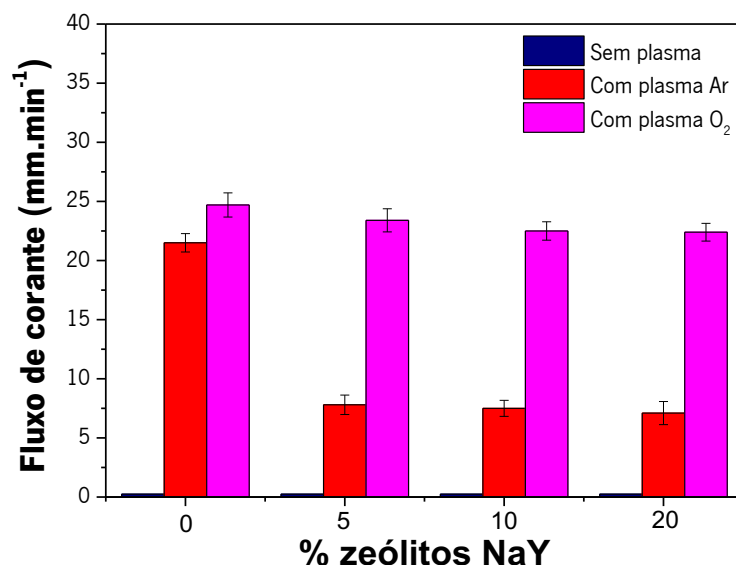


$\text{cm}^{-1}$  corresponde á estiramento vibracional da ligação C-CH<sub>3</sub> [108], seguindo-se da banda aos 1130  $\text{cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento assimétrico da ligação C-O-C com CH<sub>3</sub> [26]. Aos 1357  $\text{cm}^{-1}$  e aos 1450  $\text{cm}^{-1}$  encontram-se as bandas correspondentes aos estiramentos do grupo-metilo C-H [109] e por último o pico de maior intensidade aos 1747  $\text{cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento da ligação C=C [106, 107].

A caracterização térmica das amostras de PLLA foi realizada por DSC. A interpretação dos termogramas permite concluir que a introdução de zeólitos e a execução de tratamentos de plasma não altera significativamente as propriedades térmica das fibras de PLLA. No entanto, aparente existir uma alteração da dinâmica da transição vítrea por volta dos 60 °C com a adição de zeólitos. O conhecimento desta temperatura é importante uma vez que limita a temperatura na qual os substratos de PLLA com canais de cera são submetidos após a impressão de forma a que a mesma derreta e percorra toda a secção transversal dos substratos microfluídicos (secção 4.6). Além disso, existe uma recristalização induzida termicamente por volta dos  $\approx 80$  °C. Por outro lado, um pico de fusão na região entre os 140 e 160 °C aparece em todas as amostras, estando de acordo com a literatura [109-111]. O grau de cristalinidade foi calculado de acordo com a Equação 3.1. Os resultados demonstram que a adição de zeólitos e o tratamento com plasma de árgon a plasma de oxigénio não alteram significativamente o grau de cristalinidade, apresentando um valor de  $\approx 30$  % [89].

#### **4.3.1.4. Estudos de capilaridade**

Ensaio de capilaridade foram realizados de forma a validar a possível utilização dos substratos processados no desenvolvimento de sistemas microfluídicos. Como descrito na secção 3.8.5, os mesmos foram realizados recortando fitas finas de cada substrato e mergulhando parcialmente e verticalmente as mesmas em corante alimentar. De seguida, mediu-se o tempo que o corante demorava a percorrer a amostra no sentido "antigravitacional" de forma a calcular o fluxo por capilaridade em  $\text{mm} \cdot \text{min}^{-1}$ . Como exposto anteriormente, uma das propriedades que torna um substrato de papel interessante, e consequentemente qualquer outro substrato desenvolvido para o mesmo efeito, é de facto o seu efeito capilar e a possibilidade de gerar fluxos passivamente. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 4.6.



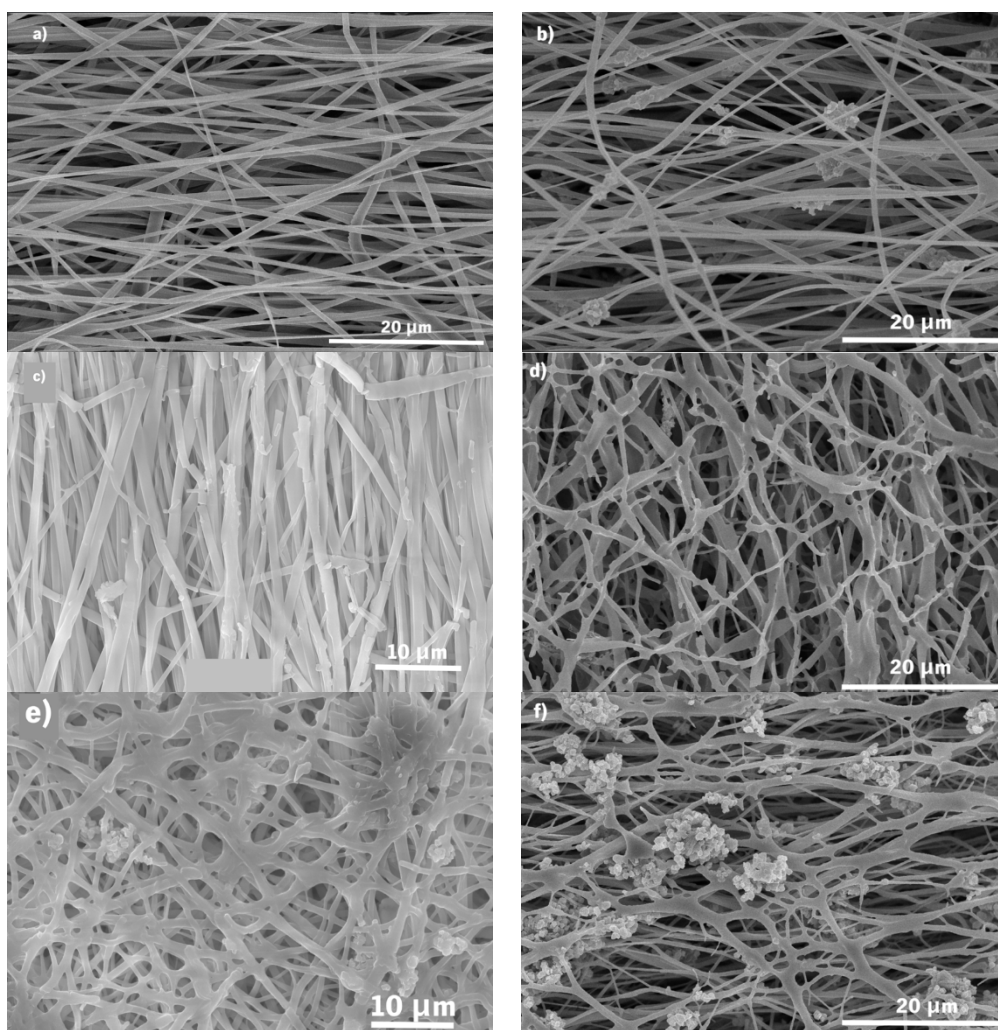
**Figura 4.6:** Estudos de capilaridade das fibras de PLLA não orientadas com concentrações crescentes de zeólitos NaY (0%, 5%, 10% e 20%) sem e com tratamento de plasma de argon (Ar) e oxigénio (O<sub>2</sub>).

Os resultados obtidos demonstram que a natureza hidrofóbica das amostras sem tratamentos de plasma teve um efeito negativo no fluxo por capilaridade, apresentando valores nulos em todas essas amostras. Por outro lado, as amostras com tratamento de plasma apresentam fluxos por capilaridade significativos, sendo o efeito superior nas amostras tratadas com plasma de oxigénio. Outra observação interessante é o facto do fluxo por capilaridade ser inferior com a presença de zeólitos, com tendência a diminuir com o aumento da concentração dos mesmos. Estes resultados podem ser justificados pela elevada capacidade de absorção dos zeólitos, levando a uma consequente diminuição do fluxo. Deste modo, estes resultados levam a concluir que a presença de zeólitos não permite alterar a hidrofobicidade de superfície, mas tem um efeito preponderante no fluxo passivo do fluido por capilaridade. Valores de fluxo por capilaridade máximos de  $\approx 25$  e  $\approx 22$  mm.min<sup>-1</sup> foram obtidos para os substratos sem zeólitos e com tratamentos de plasma com oxigénio e argon, respetivamente. Estes resultados são promissores e irão se revelar importantes nas provas de conceito que serão apresentadas posteriormente, que consiste na impressão de barreiras hidrofóbicas e posterior avaliação dos canais impressos.

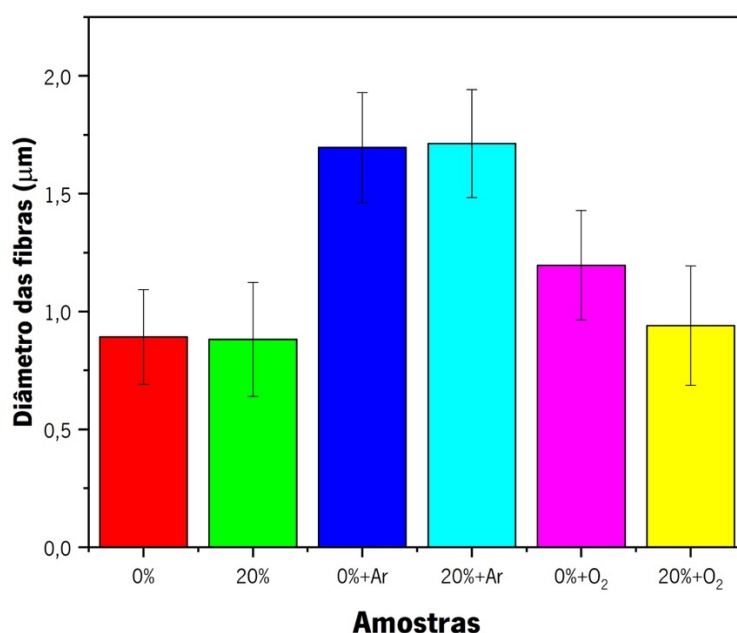
### 4.3.2. Fibras de poli(L-ácido láctico) orientadas

#### 4.3.2.1. Análise estrutural e morfológica

No que diz respeito às fibras de PLLA orientadas, tal como nas anteriores procedeu-se a uma análise morfológica e estrutural para averiguar se as fibras foram corretamente processadas, se apresentam orientação e se os zeólitos se apresentam devidamente dispersos. Os resultados estão apresentados na Figura 4.7. Além disso, a distribuição de tamanhos das fibras está apresentada na Figura 4.8. Devido a similaridade dos resultados apenas fibras orientadas sem e com 20% de zeólitos são apresentadas.



**Figura 4.7:** Imagens SEM representativas dos substratos de PLLA com fibras orientadas com: a) 0 % NaY; b) 20 % NaY; c) 0 % NaY com tratamento de plasma com argon; d) 0 % NaY com tratamento de plasma com oxigénio; e) 20 % NaY com tratamento de plasma com argon; f) 20 % NaY com tratamento de plasma com oxigénio.



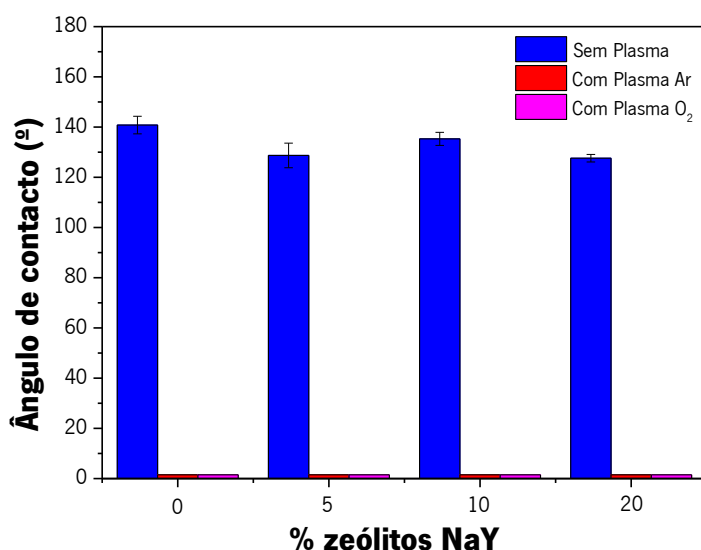
**Figura 4.8:** Distribuição de tamanho das fibras orientadas com 0 e 20 % de zeólitos, sem e com tratamento com plasma de árgon (Ar) e com plasma de oxigénio (O<sub>2</sub>).

Os resultados demonstram que as fibras se encontram devidamente processadas, evidenciando uma clara orientação no caso das amostras sem tratamento de plasma. A presença de zeólitos está igualmente confirmada como se pode observar nas Figuras 4.6b, e e f. Como expectável, o tratamento com plasma de árgon leva a alterações significativas ao nível da estrutura do material [89, 112], nomeadamente no que diz respeito ao tamanho e morfologia das fibras, sendo esse efeito mais significativo nas amostras com zeólitos. De facto, no caso das amostras de PLLA sem zeólitos, o tratamento com plasma de árgon não demonstrou influenciar a orientação das fibras, levando, no entanto, a um aumento do tamanho das mesmas de  $\approx 0.9 \mu\text{m}$  sem tratamento para  $\approx 1.7 \mu\text{m}$  com tratamento de plasma de árgon. Por outro lado, a estrutura fibrilar das amostras de PLLA orientadas com 20 % de zeólitos e tratamento com plasma de árgon ficou totalmente comprometida, havendo um aumento do tamanho das fibras e fusão das mesmas. Por sua vez, as amostras de PLLA com 0 % e 20 % de zeólitos submetidas a tratamentos de plasma de oxigénio apresentam uma estrutura fibrilar orientada comprometida com fusão de algumas fibras. No entanto, neste último caso o tamanho das fibras mantém-se praticamente inalterado. Estes últimos resultados, como já exposto anteriormente, podem ser justificados pela grande quantidade de energia fornecida pela fonte de plasma e igualmente devido a composição química do próprio

polímero em si onde ocorrem reações químicas entre espécies reativas de oxigénio e a superfície do polímero [113].

#### 4.3.2.2. Análise da hidrofobicidade de superfície

A Figura 4.9 expõe os resultados de ângulos de contacto obtido nas fibras de PLLA orientadas com a introdução de várias concentrações de zeólitos e submetidos a tratamentos de plasma de árgon e plasma de oxigénio.



**Figura 4.9:** Ângulos de contacto das fibras de PLLA orientadas com 0 e 20 % de zeólitos, sem e com tratamento com plasma de árgon (Ar) e com plasma de oxigénio (O<sub>2</sub>).

Os valores de ângulo de contacto das fibras orientadas sem tratamentos de plasma apresentam-se ligeiramente superiores aos obtidos no caso das fibras não orientadas, com valores de  $\approx 120^\circ$  e  $\approx 140^\circ$ , respetivamente, mantendo-se deste modo hidrofóbicas. Este ligeiro aumento poderá ser justificado pela alteração da morfologia das fibras de não orientadas para orientadas. Por outro lado, as fibras orientadas com tratamento de plasma de árgon e tratamento de plasma de oxigénio apresentam-se superhidrofílicas, de forma similar às amostras de PLLA não orientadas com tratamentos de plasma. Deste modo e como reportado anteriormente, embora os zeólitos não provoquem qualquer alteração no ângulo de contacto medido (sem plasma), tanto o tratamento com plasma de árgon como o tratamento de plasma com oxigénio levam a uma diminuição

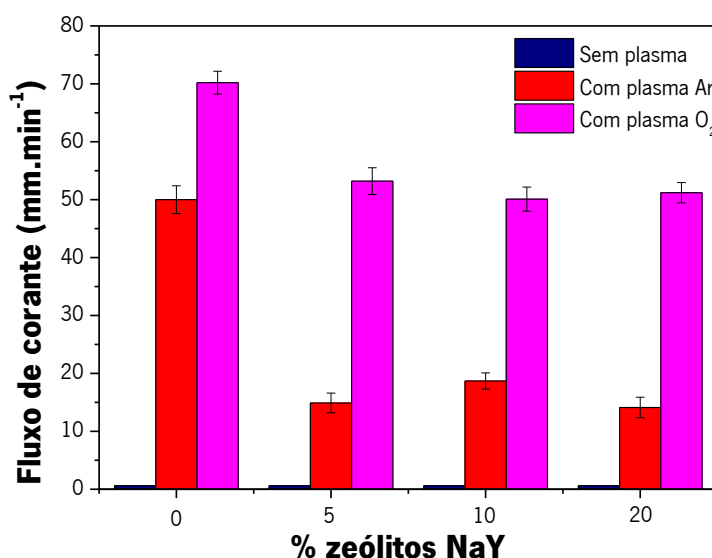
drástica do ângulo de contacto, levando a que as amostras hidrofóbicas passem a ter um comportamento superhidrofílico, apropriado para aplicações microfluídicas.

#### 4.3.2.3. Análise das propriedades físico-químicas

Análises de FTIR-ATR assim como de DSC não foram realizadas no caso das fibras de PLLA orientadas, uma vez que é expectável que apresentem os mesmos resultados que as fibras não orientadas pelo facto dos parâmetros de processamento e procedimento experimental serem similares[107, 112] .

#### 4.3.2.4. Estudos de capilaridade

Ensaio de capilaridade realizados como descrito na secção 3.8.5 foram realizados nas fibras orientadas com várias concentrações de zeólitos e submetidas a tratamentos de plasma com argon e oxigénio. Os resultados estão apresentados na Figura 4.10.



**Figura 4.10:** Estudos de capilaridade das fibras de PLLA orientadas com 0 e 20 % de zeólitos, sem e com tratamento com plasma de argon (Ar) e com plasma de oxigénio (O<sub>2</sub>).

Como expectável, as fibras orientadas sem tratamentos de plasma não apresentam qualquer fluxo, o que é justificado pela elevada hidrofobicidade apresentada pelas mesmas, independentemente da concentração de zeólitos. Em contrapartida a submissão das amostras a tratamentos de

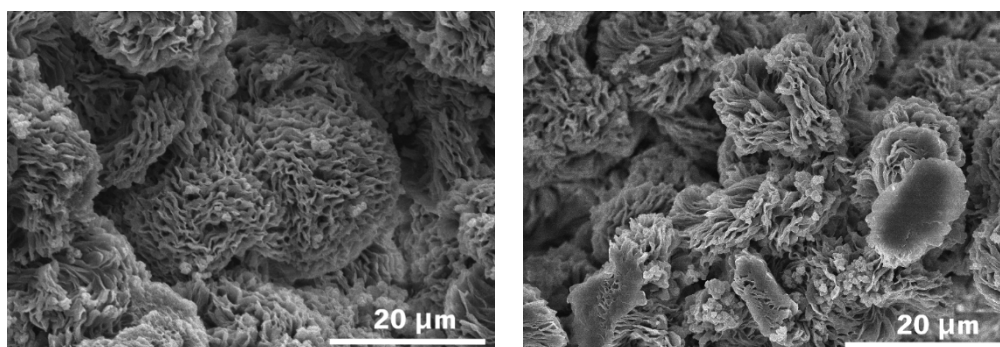
plasma com árgon e oxigénio permite o fluxo de corante passivamente. Os fluxos por capilaridade apresentam-se em todos os casos superiores aos obtidos no caso das fibras não orientadas. Fibras orientadas sem zeólitos com tratamento de plasma de árgon e com tratamento de plasma de oxigénio apresentem valores de  $\approx 50$  e  $\approx 70$  mm.min<sup>-1</sup>, muito superiores aos fluxos de  $\approx 22$  e  $\approx 25$  mm.min<sup>-1</sup> para as mesmas condições, mas fibras não orientadas. Seria de esperar que os fluxos fossem similares uma vez que a estrutura fibrilar orientada ficou comprometida com tratamentos de plasma. No entanto, o facto das fibras se apresentarem mais densas e compactas quando orientadas e antes de submetidas a tratamentos de plasma, fazem com que a mesmas, mesmo depois do plasma, se encontram mais densas. Esta maior densidade pode justificar o fato do corante fluir com mais facilidade, e por consequente mais rapidamente, ao longo das fibras. No que diz respeito aos zeólitos, e de forma similar às fibras não orientadas, ocorre uma diminuição do fluxo do corante com a presença de zeólitos, possivelmente relacionado com o poder de absorção dos mesmos, limitando o fluxo.

#### **4.4. Filmes porosos de poli(L-ácido láctico)**

Além de fibras com estrutura fibrilar, processou-se filmes porosos de PLLA pela técnica de separação de fase induzida por temperatura, de forma a estudar a influência da estrutura nas propriedades físico-químicas e de fluxos por capilaridades dos mesmos.

##### **4.4.1. Análise estrutural e morfológica**

Imagens SEM representativas de filmes porosos de PLLA com 0 e 10 % de zeólitos estão apresentadas na Figura 4.11.



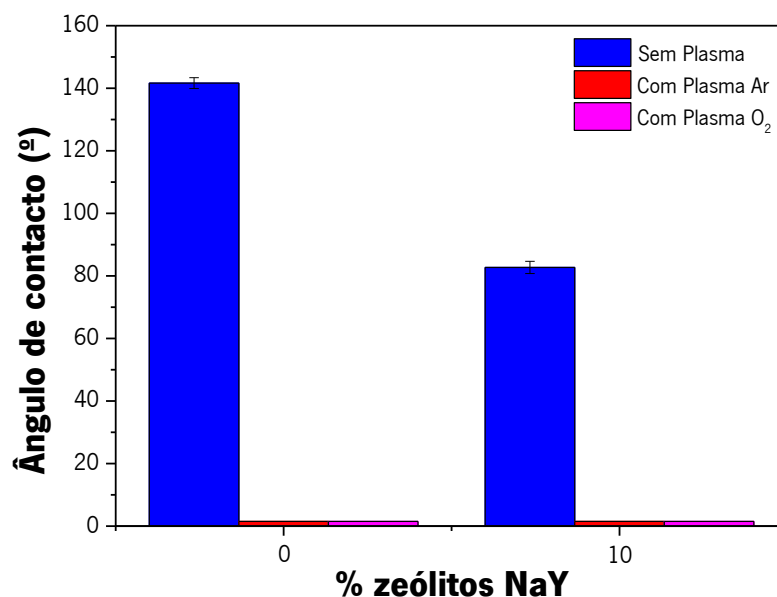
**Figura 4.11:** Imagens SEM representativas dos filmes porosos de PLLA com a) 0% de zeólitos e b) 10% de zeólitos.

É possível observar que os filmes apresentam uma estrutura porosa, aparentemente constituída por esferulites de grandes dimensões, não havendo alteração da morfologia com a adição de zeólitos (apenas uma aparente diminuição do tamanho das esferas). Uma propriedade importante destes filmes é que apresentam propriedades mecânicas inadequadas para impressão de canais por impressão a cera, razão pela qual não se efetuou nenhum estudo exaustivo da alteração da morfologia com tratamentos de plasma. De facto, enquanto os filmes constituídos por fibras se apresentam flexíveis e "esponjosos" devido à tridimensionalidade das fibras na seção transversal, os filmes porosos processados por separação de fase induzida por temperatura apresentam-se quebradiços e frágeis. No entanto, medições de ângulos de contacto, DSC e ensaios de capilaridades foram realizados e serão apresentados de seguida.

#### **4.4.2. Análise da hidrofobicidade de superfície**

De forma a avaliar a influência da alteração da estrutura morfológica do PLLA na hidrofobicidade de superfície, medições de ângulos de contato foram realizados. Os resultados obtidos para cada uma das amostras produzidas encontram-se expressos na Figura 4.12.



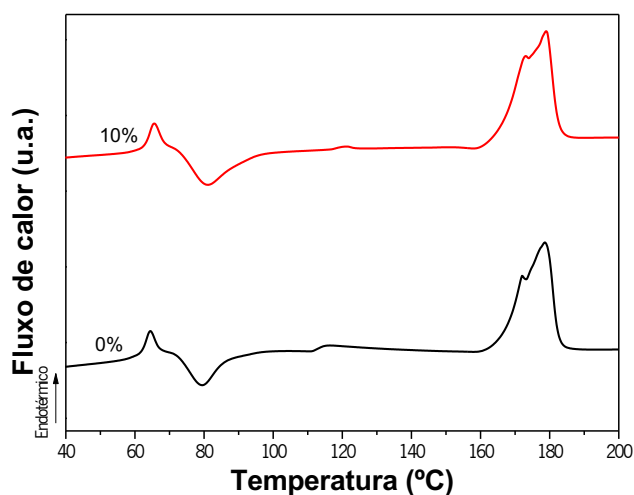


**Figura 4.12:** Ângulos de contacto dos filmes porosos de PLLA com 0% e 10% de zeólitos sem e com tratamento de plasma de árgon (Ar) e oxigénio (O<sub>2</sub>).

É possível observar que contrariamente às fibras, a adição de zeólitos leva a uma diminuição do ângulo de contato de  $\approx 140^\circ$  para  $\approx 90^\circ$ , para 0 e 10 % de zeólitos, respetivamente. Este resultado pode indicar que os zeólitos estão mais expostos (e possivelmente também mais à superfície) nos filmes porosos do que no caso das fibras. Por outro lado, como esperado, a submissão das amostras com tratamentos de plasma com árgon e com oxigénio leva a que as mesmas apresentem um comportamento superhidrofílico.

#### 4.4.3. Análise das propriedades físico-químicas

Neste caso, os estudos de FTIR-ATR não foram realizados uma vez que, pelos resultados obtidos anteriormente e como referido na literatura, não se esperam alterações significativas nas bandas de absorção pela alteração da estrutura [107]. Por outro lado, tendo em conta que um parâmetro relevante para impressão de canais hidrofóbicos para o fabrico de sistemas microfluidicos depende maioritariamente da temperatura de transição vítrea, ensaios de DSC foram realizados e apresentam-se na Figura 4.13.

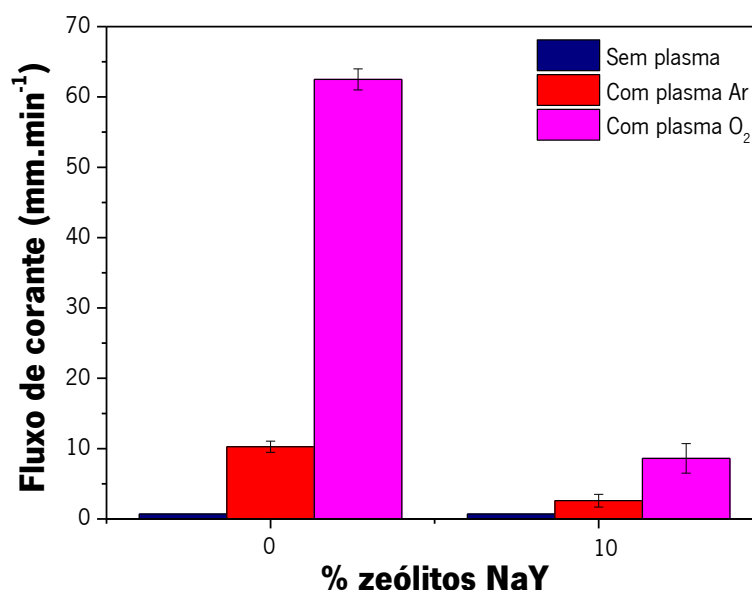


**Figura 4.13:** Curvas de DSC dos filmes de PLLA porosos com 0 e 10 % de zeólitos sem tratamentos de plasma.

Os resultados obtidos demonstram que filmes porosos de PLLA não apresentam alterações significativas comparativamente as curvas de DSC obtidas nas fibras. Um pico endotérmico por volta dos 60 °C e um pico exotérmico por volta dos 80 °C são obtidos e correspondem a temperatura de transição vítrea a temperatura de cristalização induzida termicamente, respetivamente. Em relação ao pico de fusão este situa-se numa região entre os 160°C e os 180°C, como expetável [114]. Neste caso, os cálculos de cristalinidade deram valores superiores sendo de  $\approx 47$  e  $\approx 45$  % para os filmes porosos de PLLA com 0 e 10 % de zeólitos, respetivamente. Esta ligeira variação está dentro do erro experimental.

#### 4.4.4. Estudo de capilaridade

Como ficou anteriormente saliente, uma alteração na conformação física do material pode levar a uma alteração do fluxo por capilaridade. Consequentemente, estudos de capilaridade foram realizados e os resultados encontram-se expostos na Figura 4.14.



**Figura 4.14:** Ângulos de contacto dos filmes porosos de PLLA com 0% e 10% de zeólitos sem e com tratamento de plasma de árgon (Ar) e oxigénio (O<sub>2</sub>).

Os resultados demonstram que apesar de existir uma diminuição do ângulo de contacto com a adição de zeólitos (sem tratamentos de plasma), este não foi suficiente para que ocorresse fluxo por capilaridade do corante alimentar. Por outro lado, tratamento de plasma com oxigénio nos filmes porosos de PLLA sem zeólitos permitiu atingir fluxos de  $\approx 63 \text{ mm.min}^{-1}$ , muito superior aos  $\approx 10 \text{ mm.min}^{-1}$  obtido com tratamento de plasma de árgon. Embora estes resultados promissores, a fragilidade e rigidez dos filmes porosos de PLLA não permitem a sua utilização para impressão de canais a cera, como será exposto posteriormente.

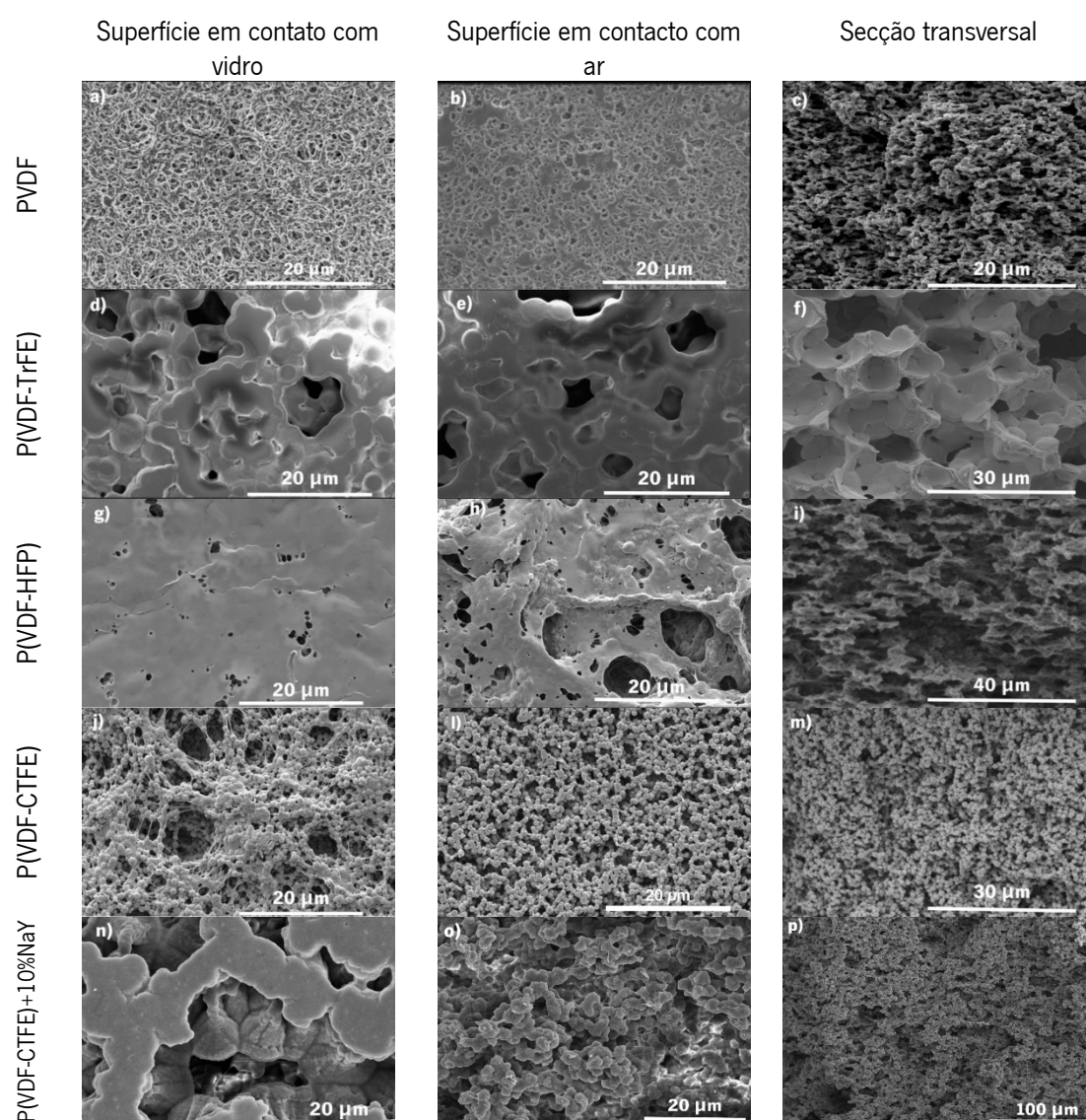
#### 4.5. Filmes porosos baseados no poli(fluoreto de vinilideno)

Um estudo complementar ao PLLA foi efetuado com PVDF e seus copolímeros. Embora não apresentem a propriedade de biodegradabilidade como o PLLA, substratos microfluídicos baseados em PVDF podem ser de grande interesse pelo facto deste material apresentar a resposta piezoelétrica mais elevada entre os polímeros. Deste modo, filmes porosos baseados em PVDF foram processados por separação de fase induzida por temperatura e caracterizados. Como exposto anteriormente, a técnica em si poder levar a obtenção de filmes com estruturas heterogéneas entre a superfície em contacto com o vidro e a superfície em contacto com o ar

durante a cristalização. Deste modo, primeiramente, filmes porosos de PVDF, P(VDF-TrFE), P(VDF-HFP) e P(VDF-TrFE) foram processados sem adição de zeólitos de forma a averiguar aquele que apresenta uma estrutura e ângulo de contacto mais homogênea. Tendo o P(VDF-CTFE) apresentado melhores resultados, como será discutido posteriormente, o mesmo foi estudado com a adição de 10 % de zeólitos.

#### 4.5.1. Análise morfológica e estrutural

Imagens SEM das amostras processadas estão apresentadas na Figura 4.15.



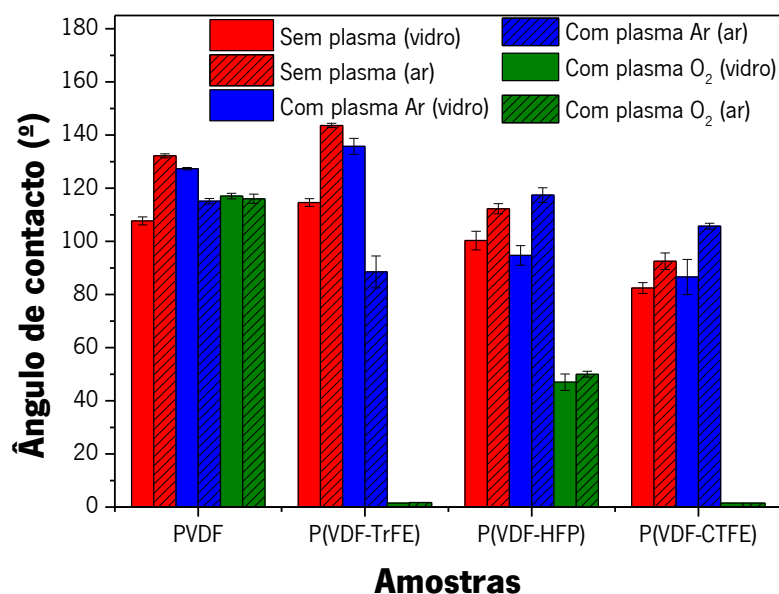
**Figura 4.15:** Imagens SEM representativas dos filmes porosos processados. a) superfície do PVDF em contacto com o vidro; b) superfície do PVDF em contacto com o ar; c) secção transversal do PVDF; d) superfície do P(VDF-TrFE) em contacto com o vidro; e) superfície do P(VDF-TrFE) em contacto com o ar; f)

secção transversal do PVDF-TrFE; g) superfície do P(VDF-HFP) em contacto com o vidro; h) superfície do P(VDF-HFP) em contacto com o ar i) secção transversal do P(VDF-HFP); j) superfície do P(VDF-CTFE) em contacto com vidro; l) superfície do P(VDF-CTFE) em contacto com o ar; m) secção transversal do P(VDF-CTFE); n) superfície do P(VDF-CTFE) com 10% de zeólitos em contacto com o vidro; o) superfície do P(VDF-CTFE) com 10% de zeólitos em contacto com o ar; p) secção transversal do P(VDF-CTFE) com 10% de zeólitos.

Pelos resultados obtidos é possível concluir que o PVDF, P(VDF-TrFE) e P(VDF-CTFE) são aqueles que apresentam uma estrutura mais homogénea, com a morfologia de superfície cristalizada em contato com o substrato de vidro muito similar a morfologia de superfície cristalizada em contato com o ar. No entanto, o P(VDF-CTFE) é a amostra que apresenta a morfologia mais similar aos substratos da *Milipore* (Figuras 4.1b e 4.1c), demonstrando o seu potencial como substrato ativo para microfluídica. O P(VDF-TrFE) apresentam igualmente morfologias muito similares em ambas as superfícies, no entanto com uma estrutura porosa diferente do P(VDF-CTFE). O P(VDF-CTFE) apresenta os poros interconectados, sendo este último caso interessante no caso de filtração de entidades pelo tamanho do poro. O P(VDF-HFP) por sua vez apresenta uma superfície pouco porosa em contato com o substrato de vidro.

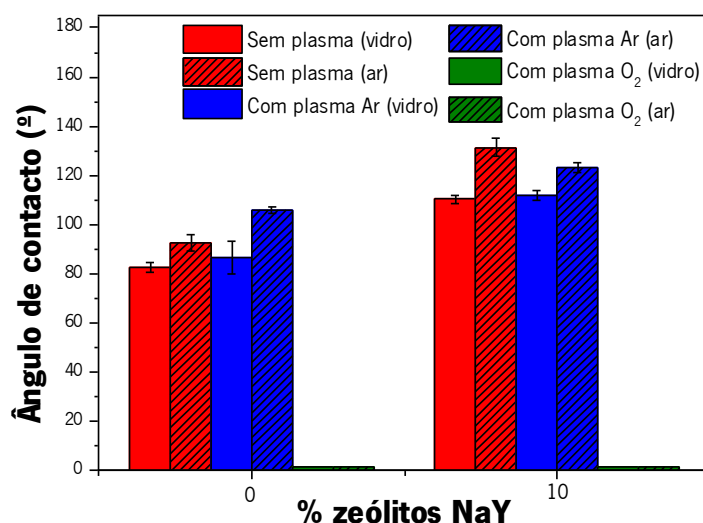
#### **4.5.2. Análise da hidrofobicidade de superfície**

Além da uniformidade da morfologia, outro fator importante advém da hidrofobicidade de superfície dos filmes porosos baseados no PVDF. Medições do ângulo de contato em ambas as superfícies dos filmes foram realizadas. Além disso, os mesmos foram sujeitos a tratamentos de plasma de argon e oxigénio de forma a verificar a eficácia deste pós-tratamento na diminuição da hidrofobicidade de superfície dos filmes, e assim averiguar aquele que apresenta maior potencial como substrato microfluídico. Os resultados estão apresentados na Figura 4.16.



**Figura 4.16:** Ângulo de contacto dos filmes porosos de PVDF, P(VDF-TrFE), P(VDF-HFP) e P(VDF-CTFE), sem e com tratamentos de plasma de árgon (Ar) e oxigénio (O<sub>2</sub>).

Os resultados demonstram que o P(VDF-CTFE) não só apresenta valores muito homogêneos de ângulos de contato entre as superfícies como apresenta os valores mais baixos antes dos tratamentos com plasma ( $\approx 90^\circ$ ). O P(VDF-TrFE) por sua vez é aquele que apresenta valores de ângulos de contato mais elevados e heterogêneo. Tratamentos de plasma com árgon não demonstram afetar significativamente a hidrofobicidade de superfície dos filmes processados. Em contrapartida, tratamentos com plasma de oxigénio permitiu diminuir a hidrofobicidade dos filmes porosos de P(VDF-HFP), e tornar os filmes de P(VDF-TrFE) e P(VDF-CTFE) superhidrofílicos. Consequentemente, considerando os resultados de SEM e de ângulos de contato, os filmes porosos de P(VDF-CTFE) são aqueles que apresentam as melhores propriedades para o desenvolvimento de sistemas microfluídicos baseados em substratos ativos, pelo que a influência da adição de 10 % zeólitos foi igualmente estudada. A Figura 4.17 ilustra os ângulos de contato de filmes de P(VDF-CTFE) com 0 e 10 % de zeólitos, sem e com tratamentos de plasma de árgon e oxigénio.

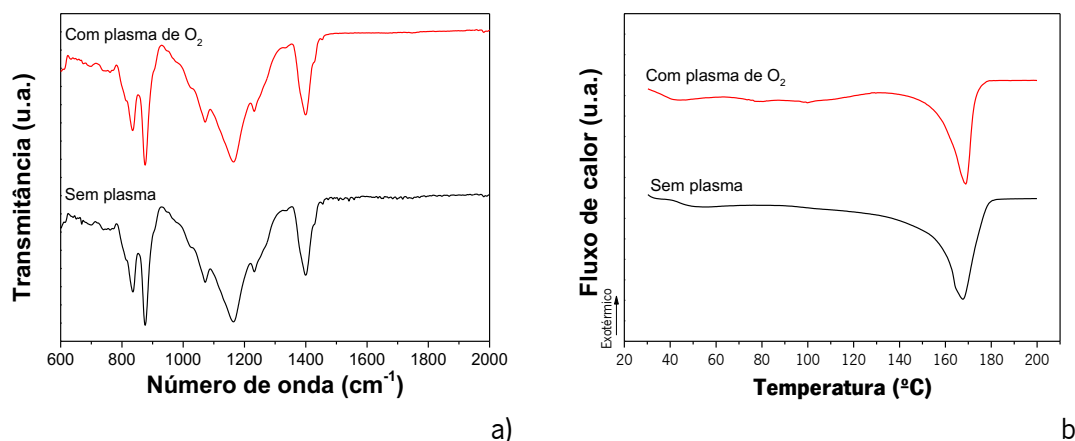


**Figura 4.17:** Ângulo de contacto dos filmes de P(VDF-CTFE) com 0% e 10% de zeólitos, sem e com tratamentos de plasma de árgon (Ar) e oxigénio (O<sub>2</sub>).

De forma similar ao PLLA, a adição de zeólitos não teve qualquer efeito benéfico na diminuição do ângulo de contato, demonstrando aliás um ligeiro aumento do ângulo de contacto com a adição de zeólitos. Os filmes porosos de P(VDF-CTFE) com e sem zeólitos apresentam o mesmo comportamento após serem submetidos a tratamentos de plasma de árgon e de oxigénio. Relativamente a morfologia (Figura 4.15 n-p), embora não seja possível observar nestas imagens a presença de zeólitos é possível verificar um aumento do tamanho das esferulitas, assim como a perda de homogeneidade morfológica entre ambas as superfícies do filme.

#### 4.5.3. Análise das propriedades físico-químicas

Tendo o plasma de oxigénio sido o único tratamento benéfico na diminuição do ângulo de contato, estudos de FTIR-ATR e DSC foram realizados e estão explícitos na Figura 4.18.



**Figura 4.18:** a) espectros de FTIR-ATR ; b) curvas de DSC dos filmes porosos de P(VDF-CTFE) sem e com tratamento de plasma de oxigênio.

Relativamente aos espectros de FTIR é possível verificar que o tratamento com plasma de oxigênio não teve qualquer efeito nas bandas de absorção. O P(VDF-CTFE) apresenta a bandas característica da fase eletroativa  $\beta$  (840 cm⁻¹), sem evidências da fase  $\alpha$  (763 cm⁻¹) [48]. As curvas de DSC dos filmes porosos de P(VDF-CTFE) sem e com tratamento de plasma de oxigênio apresentam-se igualmente similares com um ponto de fusão nos  $\approx 167$  °C. Neste caso, o grau de cristalinidade foi calculado considerando a seguinte equação:

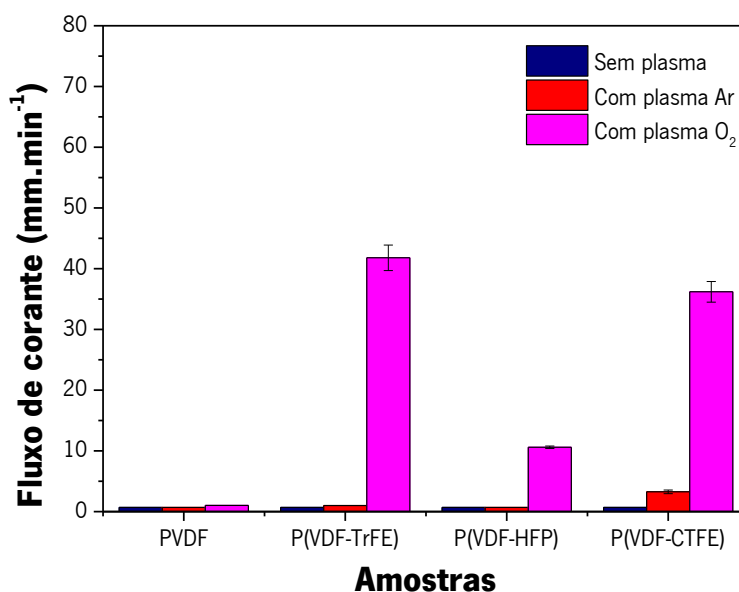
$$\Delta X_C = \frac{\Delta H_m}{x\Delta H_\alpha + y\Delta H_\beta} \times 100 \quad \text{Equação 4.1}$$

onde  $\Delta H_m$  representa a entalpia de fusão do copolímero,  $x$  e  $y$  são a quantidade de fase  $\alpha$  e  $\beta$  na amostra e  $\Delta H_\alpha$  e  $\Delta H_\beta$  são as entalpias de fusão para uma amostra totalmente cristalizada de PVDF, o que é uma aproximação válida para os copolímeros, com um valor de 93.97 e 103.4 J.g⁻¹, respetivamente[115]. Deste modo, cristalinidades de  $\approx 30$  e  $\approx 29$  % foram calculados para os filmes porosos de P(VDF-CTFE) sem e com tratamentos de plasma de oxigênio, respetivamente, estando deste modo similares dentro do erro experimental.

#### 4.5.4. Estudos de capilaridade

Embora se tenha verificado que os filmes porosos de P(VDF-CTFE) com 0 % de zeólitos e com tratamento de plasma de oxigênio eram os únicos com grande potencial para funcionar como substratos microfluídicos, ensaios de capilaridade foram efetuados em todas as amostras baseadas em PVDF. Os resultados estão apresentados na Figura 4.19.

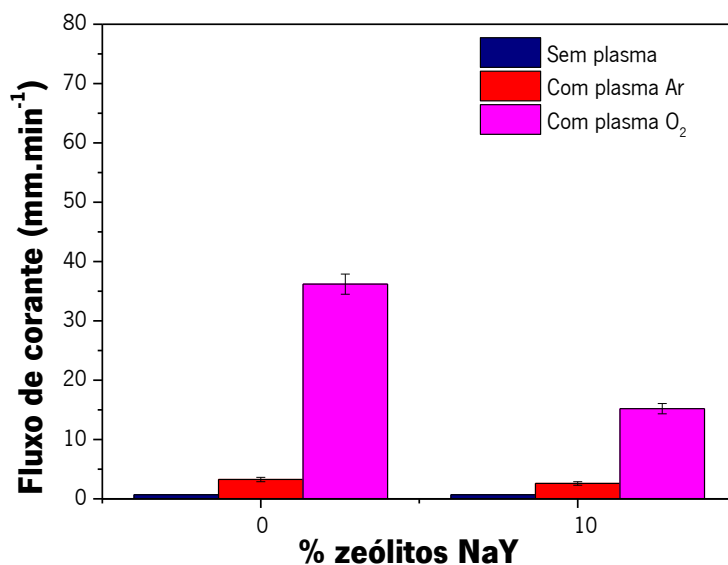




**Figura 4.19:** Fluxos capilares dos filmes porosos de PVDF, P(VDF-TrFE), P(VDF-HFP) e P(VDF-CTFE), sem e com tratamentos de plasma de árgon (Ar) e oxigénio (O<sub>2</sub>).

Os resultados obtidos estão coerentes com os resultados de ângulos de contato. Apenas os filmes porosos de P(VDF-TrFE), P(VDF-HFP) e P(VDF-CTFE) com tratamentos de plasma de oxigénio apresentam fluxos de corante. Os filmes porosos de P(VDF-TrFE) são aqueles que apresentam fluxos mais elevados com valores de  $\approx 42 \text{ mm.min}^{-1}$ , enquanto o P(VDF-CTFE) apresenta fluxos de  $\approx 36 \text{ mm.min}^{-1}$ . Por sua vez, os filmes de P(VDF-HFP) igualmente submetidos a tratamentos de plasma de oxigénio apresentam valores mais baixos de  $\approx 11 \text{ mm.min}^{-1}$ . Estes resultados são interessantes uma vez que de acordo com o material e morfologia do filme é possível controlar o fluxo de fluido, parâmetro esse que pode ser necessário controlar para determinadas aplicações.

Ensaio de capilaridade foram igualmente efetuados nos filmes porosos de P(VDF-CTFE) com 10 % de zeólitos. Os resultados estão apresentados na Figura 4.20.



**Figura 4.20:** Fluxos capilares dos filmes porosos de P(VDF-CTFE) com 0 e 10 % de zeólitos, sem e com tratamentos de plasma de árgon (Ar) e oxigénio (O<sub>2</sub>).

De forma similar às amostras de PLLA, a adição de zeólitos leva a uma diminuição do fluxo de corante, tanto no caso dos filmes de P(VDF-CTFE) com tratamento de plasma de árgon como do tratamento de plasma de oxigénio.

#### 4.6. Estudo comparativo

Na Tabela 4.1 estão sumarizados os substratos processados que apresentam propriedades adequadas para o desenvolvimento de sistemas microfluídicos. Parâmetros como o ângulo de contato, a flexibilidade das amostras e o fluxo capilar foram tidos em conta como os mais relevantes para impressão de barreiras hidrofóbicas com recurso a uma impressão a cera. O verde representa amostras com elevado potencial para funcionar como substratos para microfluídica, o vermelho representa amostras sem propriedades adequadas para microfluídica, enquanto o cinzento representa amostras que não foram avaliadas.

**Tabela 0.1:** Tabela resumo dos substratos processados e a sua validação para uso para o desenvolvimento de sistemas microfluídicos.

% zeólitos	0			5			10			20		
Plasma	Sem	Ar	O <sub>2</sub>	Sem	Ar	O <sub>2</sub>	Sem	Ar	O <sub>2</sub>	Sem	Ar	O <sub>2</sub>

PLLA fibras não orientadas	-	√	√	-	√	√	-	√	√	-	√	√
PLLA fibras orientadas	-	√	√	-	√	√	-	√	√	-	√	√
Filmes porosos de PLLA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Filmes porosos de PVDF	-	-	-									
Filmes porosos de P(VDF-TrFE)	-	-	√									
Filmes porosos de P(VDF-HFP)	-	-	√									
Filmes porosos de P(VDF-CTFE)	-	-	√				-	-	√			

A primeira conclusão diz respeito aos filmes porosos de PLLA que embora demonstrem fluxo por capilaridade, as suas propriedades frágeis e quebradiças não permitem o seu uso para impressão de barreiras hidrofóbicas por impressão. Verificou-se que a adição de zeólitos diminui o fluxo. Por outro lado, o tratamento das amostras com argon revelou-se eficiente apenas nas fibras de PLLA não orientadas e orientadas. Por fim, o tratamento de plasma com oxigénio revelou ser o mais adequado, apresentando em todos os casos fluxo superiores, a exceção dos filmes porosos de PVDF em que não houve qualquer alteração da hidrofobicidade de superfície.

#### 4.7. Prova de conceito

Para finalizar este trabalho, os substratos desenvolvidos com maior potencial para o fabrico de sistemas microfluídicos foram testados através da impressão de barreiras hidrofóbicas a funcionar como canais com recurso a uma impressora a cera (técnica comumente utilizado para o fabrico de sistemas microfluídicos em papel). O procedimento experimental está descrito na secção 3.8.6. Devido a transição vítrea do PLLA ser muito baixa, estas amostras impressas foram colocadas numa placa de aquecimento a 60 °C durante 10 min de forma a garantir a integridade das mesmas e garantir igualmente que a cera penetrasse toda a seção transversal. Além disso, o fluxo por capilaridade ao longo do canal foi igualmente determinado. Neste caso, os substratos foram mantidos numa base horizontal e 40 µL de corante alimentar foi colocado na entrada do canal com a ajuda de uma micropipeta e o tempo que este demorava a percorrer o canal foi determinado. Na Figura 4.20 estão ilustradas fotografias representativas de substratos comerciais

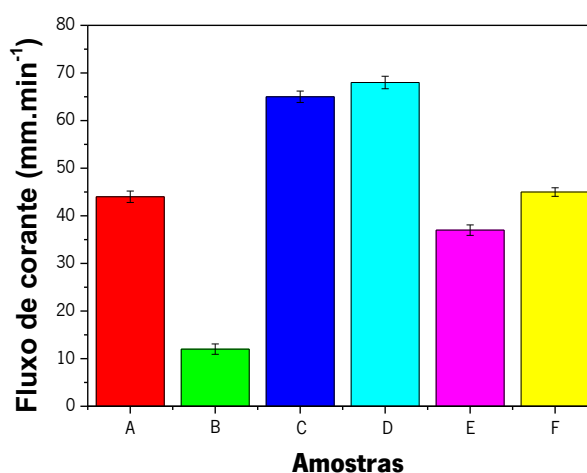
assim como das amostras processadas sem zeólitos e submetidas a tratamentos com plasma de oxigénio.



**Figura 4.21:** Fotografias de canais impressos com impressora a cera em substratos comerciais e substratos desenvolvidos no âmbito deste trabalho.

Os resultados obtidos demonstram claramente que os substratos desenvolvidos e apresentados anteriormente são adequados para o fabrico de sistemas microfluidicos. O facto de o corante estar confinado no interior das barreiras hidrofóbicas comprova que o processo de impressão a cera foi efetuado com sucesso.

Na Figura 4.22 estão apresentados os valores de capilaridade obtidos.



**Figura 4.22:** Fluxos capilares dos substratos comerciais: a) *Whatman n°1*; b) *HF090 da Millipore*, e dos substratos desenvolvidos ao longo deste trabalho sem zeólitos e tratados com plasma de oxigénio: c) fibras de PLLA não orientadas; d) fibras de PLLA orientadas; e) filmes porosos de P(VDF-CTFE); f) filmes porosos de P(VDF-TrFE).

Os resultados obtidos são de facto promissores. Velocidades similares e mesmo superiores aos substratos comerciais comumente utilizados foram obtidos. Seria, no entanto, de esperar que o

fluxo nas fibras orientadas fosse superior às fibras não orientadas, como aconteceu nos ensaios de capilaridade "antigravitacionais". No entanto, este resultado pode ser justificado pelo fato das amostras passarem por uma prensa antes da impressão, fazendo com que a densidade das fibras entre ambas a amostra passasse a ser mais aproximada. O resto das amostras apresentam valores de fluxo similares aos obtidos nos ensaios de capilaridade "antigravitacionais". Verifica-se igualmente que substratos fibrilares tais como o *Whatman no. 1* e fibras de PLLA não orientadas e orientadas apresentam valores de fluxo superiores a substratos como estrutura porosa como o *HF090*, P(VDF-TrFE) e P(VDF-CTFE).

De acordo com todos os resultados apresentados anteriormente, é possível concluir que o tipo de material, a morfologia, a concentração de zeólitos assim como o pós-tratamento com plasma de árgon ou oxigênio influenciam o fluxo obtido. Deste modo, de acordo com a aplicação em causa, o valor do fluxo que pode ter um papel preponderante na eficiência do sistema microfluidico, pode ser ajustado e controlado adequadamente os parâmetros referidos anteriormente. Os substratos processados demonstram assim um grande potencial para aumentar a limitada gama de substratos atualmente disponíveis para o desenvolvimento de sistemas microfluídicos, assim como a possibilidade de atuar ativamente no fluxo através das propriedades eletroativas apresentadas pelos mesmos. A influência desta característica constituirá um trabalho futuro, de forma a avaliar o seu efeito na eficiência de sistemas microfluídicos em aplicações específicas, como algumas de diagnóstico clínico, que envolvem reações entre amostra e reagente, pelo que o aumento da taxa de reação é um requisito fundamentalmente que dificilmente é atingido com substratos passivos.



## **5. Conclusões e perspectivas futuras**





## 5.1. Conclusões

O objetivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento de novos substratos, alternativos ao papel, para o fabrico de sistemas microfluídicos, tendo por base materiais inteligentes. Deste modo, substratos polímeros com propriedades piezoelétricas baseados no PLLA, PVDF e seus copolímeros ((P(VDF-CTFE), P(VDF-TrFE) e P(VDF-HFP)) foram processados por eletrofiação e separação de fase induzida por temperatura para a obtenção de fibras e filmes porosos, respetivamente. Estas morfologias foram escolhidas de forma a tentar mimetizar os substratos comercialmente disponíveis para o fabrico de sistemas microfluídicos como o Whatman n°1 que apresenta uma estrutura fibrilar e os substratos *Hi-FlowPlus* da *Millipore* que apresenta uma estrutura porosa, que servem apenas de substratos passivos, sem qualquer ação sobre os fluidos. O PLLA apresenta a vantagem de ser biodegradável ao passo que o PVDF e seus copolímeros, não sendo biodegradáveis, apresentam respostas piezoelétricas superiores. Todos estes polímeros apresentam propriedades hidrofóbicas, pelo que a adição de zeólitos hidrofílicos NaY na matriz polimérica e tratamentos por plasma de árgon e oxigénio terem sido efetuados com o intuito de tornar os materiais hidrofílicos e assim passíveis de serem utilizados como substratos para microfluídica.

Após a devida caracterização morfológica, físico-química e após a realização de ensaios de capilaridade, foi possível concluir que a adição de zeólitos não permitiu promover a diminuição da hidrofobicidade de superfícies dos polímeros processados. O revestimento dos zeólitos com uma fina camada polimérica é uma possível explicação para este resultado. Outra possível explicação advém do facto da rugosidade de superfície sobrepor-se ao efeito absorvente dos zeólitos. Em contrapartida, o pós-tratamento das amostras com plasma de árgon e oxigénio mostrou-se eficiente para a obtenção de um comportamento superhidrofílico para todas os substratos de PLLA, sendo eles fibras não orientadas, fibras orientadas e filmes porosos. À custa desta alteração, a morfologia das fibras ficou comprometida, com alguma fusão das mesmas, principalmente no caso de tratamentos com plasma de árgon, enquanto que em ambos os casos um aumento do diâmetro das fibras foi observado. Uma otimização dos parâmetros de plasma poderá uma opção no futuro de forma a encontrar um balanço entre a obtenção de amostras hidrofílicas sem alteração significativa da morfologia. Relativamente aos filmes porosos de PLLA, estes demonstraram não ter propriedades mecânicas adequadas para utilização como substrato para

microfluídico por se apresentarem frágeis e quebradiças. Nos ensaios de capilaridade "antigravitacionais" foi possível verificar que as fibras orientadas permitem um maior fluxo de fluido corante do que fibras não orientadas (com tratamentos de plasma). No que diz respeito aos filmes porosos baseados no PVDF, apenas o pós-tratamento com plasma de oxigénio se mostrou adequado, tendo sido efetivo no caso no P(VDF-TrFE), P(VDF-HFP) e P(VDF-CTFE). No entanto, as imagens SEM assim como os ângulos de contatos medidos permitam concluir que os filmes porosos de P(VDF-CTFE) são aqueles que apresentam uma morfologia mais homogénea, com ângulos de contacto mais baixos e com estrutura porosa muito similar aos substratos comerciais da *Millipore*. Analisando os resultados de todas as amostras processadas, é possível afirmar que pós-tratamentos com plasma de oxigénio permite fluxos mais elevados ao passo que a adição de zeólitos nestas amostras levam a uma diminuição do fluxo possivelmente devido à capacidade de absorção dos zeólitos. Embora não tenham sido efetuados, é de conhecimento científico que os tratamentos de plasma de oxigénio em filmes baseados no PVDF tornam-nos citotóxicos e assim impraticáveis para aplicações biotecnológicas. No entanto, trabalhos paralelos comprovaram que é possível colmatar esta limitação através do revestimento destes materiais com polímeros hidrofílicos e biocompatível como o polietilenoglicol. Em nenhum caso, a adição de zeólitos ou o pós-tratamento das amostras com plasma levou a alterações significativas das bandas de absorção no FTIR-ATR e das propriedades térmicas.

Para finalizar este trabalho, todas os substratos com propriedades promissoras (PLLA, P(VDF-CTFE) e P(VDF-TrFE) sem zeólitos e com tratamentos de plasma de oxigénio foram testados para o fabrico de sistemas microfluídicos. Para tal, canais foram desenhados num programa CAD e impressos por impressão a cera de forma a criar barreiras hidrofóbicas. A título comparativo, o mesmo procedimento foi realizado nos substratos comerciais *Whatman n°1* e *HF090* da *millipore*. Os resultados mostram-se promissores visto que o processo de impressão das barreiras hidrofóbicas foi efetuado com sucesso, permitindo o confinamento de fluidos no interior do canal. Além disso, os fluxos calculados, recorrendo a corante alimentar, dos substratos processados são similares e até mesmo superiores aos materiais comerciais. Neste caso, verificou-se que fluxos superiores foram obtidos nas fibras de PLLA com valores de  $\approx 67 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$  comparativamente, independentemente da orientação, enquanto que valores de  $\approx 44$ ,  $\approx 12$ ,  $\approx 37$  e  $\approx 45 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$  foram obtidos nos substratos Whatman, HF090, P(VDF-CTFE) e P(VDF-TrFE). O facto de as amostras passarem por uma prensa antes da impressão pode justificar o facto dos fluxos das fibras de PLLA não orientadas e orientadas serem semelhantes.

Tendo em conta os resultados obtidos, é possível afirmar que os materiais poliméricos com propriedades eletroativos processados têm um elevado potencial para transferência tecnológica e virem a ser aplicados como materiais alternativos ao papel no desenvolvimento de sistemas microfluídicos.

Desta forma, os objetivos definidos neste trabalho de dissertação foram cumpridos e foram construídos novos métodos e desafios para continuar a investigação realizada.

## **5.2. Perspetivas futuras**

O presente trabalho constitui uma base sólida para estudos futuros no desenvolvimento de substratos ativos para microfluídica.

Deste modo, sugere-se como trabalhos futuros:

- Testar os substratos em aplicações reais, substituindo o substrato de papel pelos materiais processados;
- Testar o efeito das propriedades piezoelétricas em aplicações que requerem um controlo do fluxo e/ou reação de fluidos;
- Testar outros aditivos hidrofílicos que permitem eliminar a necessidade de tratamentos com plasma que aumenta o tempo de processamento e levam à obtenção de substratos citotóxicos no caso do PVDF;
- Estudar novos materiais com outras propriedades ativas, outras morfologias e outros métodos de processamento;
- Testar outras técnicas de impressão de barreiras hidrofóbicas recorrendo por exemplo à impressão a jato de tinta (*inkjet printing*);



## Referências bibliográficas

1. Whitesides GM. The origins and the future of microfluidics. *Nature*. 2006;442:368.
2. Yager P, Edwards T, Fu E, Helton K, Nelson K, Tam MR, et al. Microfluidic diagnostic technologies for global public health. *Nature*. 2006;442(7101):412.
3. Cai H, Parks JW, Wall TA, Stott MA, Stambaugh A, Alfson K, et al. Optofluidic analysis system for amplification-free, direct detection of Ebola infection. *Scientific Reports*. 2015;5:14494.
4. Magro L, Jacquelin B, Escadafal C, Garneret P, Kwasiborski A, Manuguerra J-C, et al. Paper-based RNA detection and multiplexed analysis for Ebola virus diagnostics. *Scientific Reports*. 2017;7(1):1347.
5. Martinez AW, Phillips ST, Whitesides GM, Carrilho E. Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices. ACS Publications; 2009.
6. Martinez AW, Phillips ST, Wiley BJ, Gupta M, Whitesides GM. FLASH: a rapid method for prototyping paper-based microfluidic devices. *Lab on a Chip*. 2008;8(12):2146-50.
7. Du L, Xu H, Zhang Y, Zou F. Electrospinning of polycaprolactone nanofibers with DMF additive: The effect of solution proprieties on jet perturbation and fiber morphologies. *Fibers and Polymers*. 2016;17(5):751-9.
8. Fujii T. PDMS-based microfluidic devices for biomedical applications. *Microelectronic Engineering*. 2002;61:907-14.
9. Chiu DT, deMello AJ, Di Carlo D, Doyle PS, Hansen C, Maceiczky RM, et al. Small but Perfectly Formed? Successes, Challenges, and Opportunities for Microfluidics in the Chemical and Biological Sciences. *Chem*. 2017;2(2):201-23.
10. Huh D, Hamilton GA, Ingber DE. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends in cell biology*. 2011;21(12):745-54.
11. Sieben VJ, Debes-Marun CS, Pilarski LM, Backhouse CJ. An integrated microfluidic chip for chromosome enumeration using fluorescence in situ hybridization. *Lab on a Chip*. 2008;8(12):2151-6.
12. Terry SC, Jerman JH, Angell JB. A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer. *IEEE transactions on electron devices*. 1979;26(12):1880-6.
13. Auroux P-A, Iossifidis D, Reyes DR, Manz A. Micro Total Analysis Systems. 2. Analytical Standard Operations and Applications. *Analytical Chemistry*. 2002;74(12):2637-52.
14. Butler JM. Chapter 6 - Capillary Electrophoresis: Principles and Instrumentation. In: Butler JM, editor. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. San Diego: Academic Press; 2012. p. 141-65.
15. Manz A, Harrison DJ, Verpoorte EM, Fettingner JC, Paulus A, Lüdi H, et al. Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems: capillary electrophoresis on a chip. *Journal of Chromatography A*. 1992;593(1-2):253-8.
16. McDonald JC, Duffy DC, Anderson JR, Chiu DT, Wu H, Schueller OJ, et al. Fabrication of microfluidic systems in poly (dimethylsiloxane). *ELECTROPHORESIS: An International Journal*. 2000;21(1):27-40.

17. Stroock AD, Dertinger SK, Ajdari A, Mezić I, Stone HA, Whitesides GM. Chaotic mixer for microchannels. *Science*. 2002;295(5555):647-51.
18. Rapp BE. Chapter 9 - Fluids. In: Rapp BE, editor. *Microfluidics: Modelling, Mechanics and Mathematics*. Oxford: Elsevier; 2017. p. 243-63.
19. Plevniak K, Campbell M, Myers T, Hodges A, He M. 3D printed auto-mixing chip enables rapid smartphone diagnosis of anemia. *Biomicrofluidics*. 2016;10(5):054113.
20. Cardoso VF, Catarino SO, Nunes JS, Rebouta L, Rocha J, Lanceros-Méndez S, et al. Lab-on-a-chip with  $\beta$ -poly (vinylidene fluoride) based acoustic microagitation. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. 2010;57(5):1184-90.
21. Reyes DR, Iossifidis D, Auroux P-A, Manz A. Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology. *Analytical chemistry*. 2002;74(12):2623-36.
22. Ng JM, Gitlin I, Stroock AD, Whitesides GM. Components for integrated poly (dimethylsiloxane) microfluidic systems. *Electrophoresis*. 2002;23(20):3461-73.
23. Lee JN, Park C, Whitesides GM. Solvent compatibility of poly (dimethylsiloxane)-based microfluidic devices. *Analytical chemistry*. 2003;75(23):6544-54.
24. Tang SK, Whitesides GM. Basic microfluidic and soft lithographic techniques. *Optofluidics: Fundamentals, Devices and Applications*: McGraw-Hill; 2010. p. 7-32.
25. McDonald JC, Whitesides GM. Poly(dimethylsiloxane) as a Material for Fabricating Microfluidic Devices. *Accounts of Chemical Research*. 2002;35(7):491-9.
26. Jing N, Jiang X, Wang Q, Tang Y, Zhang P. Attenuated total reflectance/Fourier transform infrared (ATR/FTIR) mapping coupled with principal component analysis for the study of in vitro degradation of porous polylactide/hydroxyapatite composite material. *Analytical Methods*. 2014;6(15):5590-5.
27. Kirikova MN, Agina EV, Bessonov AA, Sizov AS, Borshchev OV, Trul AA, et al. Direct-write printing of reactive oligomeric alkoxysilanes as an affordable and highly efficient route for promoting local adhesion of silver inks on polymer substrates. *Journal of Materials Chemistry C*. 2016;4(11):2211-8.
28. Anderson JR, Chiu DT, Jackman RJ, Cherniavskaya O, McDonald JC, Wu H, et al. Fabrication of topologically complex three-dimensional microfluidic systems in PDMS by rapid prototyping. *Analytical chemistry*. 2000;72(14):3158-64.
29. Eddings MA, Johnson MA, Gale BK. Determining the optimal PDMS–PDMS bonding technique for microfluidic devices. *Journal of Micromechanics and Microengineering*. 2008;18(6):067001.
30. Tsao C-W, DeVoe DL. Bonding of thermoplastic polymer microfluidics. *Microfluidics and Nanofluidics*. 2009;6(1):1-16.
31. Ren K, Dai W, Zhou J, Su J, Wu H. Whole-Teflon microfluidic chips. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(20):8162-6.
32. Slaughter BV, Khurshid SS, Fisher OZ, Khademhosseini A, Peppas NA. Hydrogels in regenerative medicine. *Advanced materials*. 2009;21(32-33):3307-29.
33. Caló E, Khutoryanskiy VV. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*. 2015;65:252-67.
34. Tibbitt MW, Anseth KS. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnology and bioengineering*. 2009;103(4):655-63.
35. Mukhopadhyay R. When PDMS isn't the best. *Analytical Chemistry*. 2007;79(9):3248-53.
36. Yetisen AK, Akram MS, Lowe CR. based microfluidic point-of-care diagnostic devices. *Lab on a Chip*. 2013;13(12):2210-51.

37. Costa M, Veigas B, Jacob J, Santos D, Gomes J, Baptista P, et al. A low cost, safe, disposable, rapid and self-sustainable paper-based platform for diagnostic testing: lab-on-paper. *Nanotechnology*. 2014;25(9):094006.
38. Lei KF, Huang C-H, Tsang N-M. Impedimetric quantification of cells encapsulated in hydrogel cultured in a paper-based microchamber. *Talanta*. 2016;147:628-33.
39. Carrilho E, Martinez AW, Whitesides GM. Understanding wax printing: a simple micropatterning process for paper-based microfluidics. *Analytical chemistry*. 2009;81(16):7091-5.
40. Alrifaiy A, Lindahl OA, Ramser K. Polymer-based microfluidic devices for pharmacy, biology and tissue engineering. *Polymers*. 2012;4(3):1349-98.
41. Cai L, Wu Y, Xu C, Chen Z. A Simple Paper-Based Microfluidic Device for the Determination of the Total Amino Acid Content in a Tea Leaf Extract. *Journal of Chemical Education*. 2013;90(2):232-4.
42. Yang Y, Noviana E, Nguyen MP, Geiss BJ, Dandy DS, Henry CS. based microfluidic devices: Emerging themes and applications. *Analytical chemistry*. 2016;89(1):71-91.
43. Sochol RD, Sweet E, Glick CC, Wu S-Y, Yang C, Restaino M, et al. 3D printed microfluidics and microelectronics. *Microelectronic Engineering*. 2018;189:52-68.
44. Butler SA, Khanlian SA, Cole LA. Detection of early pregnancy forms of human chorionic gonadotropin by home pregnancy test devices. *Clinical Chemistry*. 2001;47(12):2131-6.
45. Hu J. The evolution of commercialized glucose sensors in China. *Biosensors and Bioelectronics*. 2009;24(5):1083-9.
46. Murray CK, Gasser RA, Magill AJ, Miller RS. Update on rapid diagnostic testing for malaria. *Clinical microbiology reviews*. 2008;21(1):97-110.
47. Rohrman BA, Leautaud V, Molyneux E, Richards-Kortum RR. A lateral flow assay for quantitative detection of amplified HIV-1 RNA. *PLoS One*. 2012;7(9):e45611.
48. Martins P, Lopes A, Lanceros-Mendez S. Electroactive phases of poly (vinylidene fluoride): determination, processing and applications. *Progress in polymer science*. 2014;39(4):683-706.
49. Bar-Cohen Y, Kim KJ, Choi HR, Madden JD. Electroactive polymer materials. *Smart Materials and Structures*. 2007;16(2).
50. Bremerman J, Bronocco S, Caffey B, Kent T, Reed E, Lee E, et al. Piezoelectric Sensing and Energy Harvesting in Touchscreens 2017.
51. Chen J-P, Su C-H. Surface modification of electrospun PLLA nanofibers by plasma treatment and cationized gelatin immobilization for cartilage tissue engineering. *Acta biomaterialia*. 2011;7(1):234-43.
52. Ribeiro C, Sencadas V, Correia DM, Lanceros-Méndez S. Piezoelectric polymers as biomaterials for tissue engineering applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2015;136:46-55.
53. Gupta A, Kumar V. New emerging trends in synthetic biodegradable polymers–Polylactide: A critique. *European polymer journal*. 2007;43(10):4053-74.
54. Ribeiro C, Sencadas V, Areias AC, Gama FM, Lanceros-Méndez S. Surface roughness dependent osteoblast and fibroblast response on poly (l-lactide) films and electrospun membranes. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2015;103(7):2260-8.

55. Correia D, Ribeiro C, Botelho G, Borges J, Lopes C, Vaz F, et al. Superhydrophilic poly (l-lactic acid) electrospun membranes for biomedical applications obtained by argon and oxygen plasma treatment. *Applied Surface Science*. 2016;371:74-82.
56. hoon Kim T, Arias AC. Characterization and applications of piezoelectric polymers. 2015.
57. Martins P, Lopes AC, Lanceros-Mendez S. Electroactive phases of poly(vinylidene fluoride): Determination, processing and applications. *Progress in Polymer Science*. 2014;39(4):683-706.
58. Sencadas V, Gregorio Jr R, Lanceros-Méndez S.  $\alpha$  to  $\beta$  phase transformation and microestructural changes of PVDF films induced by uniaxial stretch. *Journal of Macromolecular Science®*. 2009;48(3):514-25.
59. Bauer S, Bauer F. Piezoelectric polymers and their applications. *Piezoelectricity: Springer*; 2008. p. 157-77.
60. Cardoso VF, Machado AR, Pinto VC, Sousa PJ, Botelho G, Minas G, et al. From superhydrophobic-to superhydrophilic-patterned poly (vinylidene fluoride-co-chlorotrifluoroethylene) architectures as a novel platform for biotechnological applications. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. 2016;54(18):1802-10.
61. Croce F, Focarete ML, Hassoun J, Meschini I, Scrosati B. A safe, high-rate and high-energy polymer lithium-ion battery based on gelled membranes prepared by electrospinning. *Energy & Environmental Science*. 2011;4(3):921-7.
62. Sousa RE, Kundu M, Gören A, Silva MM, Liu L, Costa CM, et al. Poly (vinylidene fluoride-co-chlorotrifluoroethylene)(PVDF-CTFE) lithium-ion battery separator membranes prepared by phase inversion. *RSC Advances*. 2015;5(110):90428-36.
63. Martins P, Miranda R, Marques J, Tavares CJ, Botelho G, Lanceros-Mendez S. Comparative efficiency of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in suspension vs. immobilization into P (VDF–TrFE) porous membranes. *RSC Advances*. 2016;6(15):12708-16.
64. Noiphung J, Songjaroen T, Dungchai W, Henry CS, Chailapakul O, Laiwattanapaisa W. Electrochemical detection of glucose from whole blood using paper-based microfluidic devices. *Analytica chimica acta*. 2013;788:39-45.
65. Jang K-J, Mehr AP, Hamilton GA, McPartlin LA, Chung S, Suh K-Y, et al. Human kidney proximal tubule-on-a-chip for drug transport and nephrotoxicity assessment. *Integrative Biology*. 2013;5(9):1119-29.
66. Huh D, Matthews BD, Mammoto A, Montoya-Zavala M, Hsin HY, Ingber DE. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science*. 2010;328(5986):1662-8.
67. San Park T, Yoon J-Y. Smartphone detection of *Escherichia coli* from field water samples on paper microfluidics. *IEEE Sensors Journal*. 2015;15(3):1902-7.
68. Srisa-Art M, Boehle KE, Geiss BJ, Henry CS. Highly Sensitive Detection of *Salmonella typhimurium* Using a Colorimetric Paper-Based Analytical Device Coupled with Immunomagnetic Separation. *Analytical chemistry*. 2017;90(1):1035-43.
69. Zhu J, Qiu C, Palla M, Nguyen T, Russo JJ, Ju J, et al. A microfluidic device for multiplex single-nucleotide polymorphism genotyping. *RSC advances*. 2014;4(9):4269-77.
70. Chen YH, Chen SH. Analysis of DNA fragments by microchip electrophoresis fabricated on poly (methyl methacrylate) substrates using a wire-imprinting method. *ELECTROPHORESIS: An International Journal*. 2000;21(1):165-70.



71. Saito M, Uchida N, Furutani S, Murahashi M, Espulgar W, Nagatani N, et al. Field-deployable rapid multiple biosensing system for detection of chemical and biological warfare agents. *Microsystems & Nanoengineering*. 2018;4:17083.
72. Bhardwaj N, Kundu SC. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*. 2010;28(3):325-47.
73. Sill TJ, von Recum HA. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*. 2008;29(13):1989-2006.
74. Nerurkar NL, Baker BM, Chen C, Elliott DM, Mauck RL, editors. *Engineering of Fiber-Reinforced Tissues with Anisotropic Biodegradable Nanofibrous Scaffolds*. 2006 International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society; 2006 30 Aug.-3 Sept. 2006.
75. Doshi J, Reneker DH. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *Journal of Electrostatics*. 1995;35(2):151-60.
76. Deitzel JM, Kleinmeyer J, Harris D, Beck Tan NC. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer*. 2001;42(1):261-72.
77. Uyar T, Besenbacher F. Electrospinning of uniform polystyrene fibers: The effect of solvent conductivity. *Polymer*. 2008;49(24):5336-43.
78. Megelski S, Stephens JS, Chase DB, Rabolt JF. Micro- and Nanostructured Surface Morphology on Electrospun Polymer Fibers. *Macromolecules*. 2002;35(22):8456-66.
79. Bakar SSS, Fong KC, Eleyas A, Nazeri MFM. Effect of Voltage and Flow Rate Electrospinning Parameters on Polyacrylonitrile Electrospun Fibers. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 2018;318(1):012076.
80. De Vrieze S, Van Camp T, Nelvig A, Hagström B, Westbroek P, De Clerck K. The effect of temperature and humidity on electrospinning. *Journal of Materials Science*. 2008;44(5):1357.
81. Sencadas V, Ribeiro C, Heredia A, BdiKin IK, Kholkin AL, Lanceros-Mendez S. Local piezoelectric activity of single poly(L-lactic acid) (PLLA) microfibers. *Applied Physics A: Materials Science and Processing*. 2012;109(1):51-5.
82. Nunes-Pereira J, Lima R, Choudhary G, Sharma PR, Ferdov S, Botelho G, et al. Highly efficient removal of fluoride from aqueous media through polymer composite membranes. *Separation and Purification Technology*. 2018;205:1-10.
83. Ribeiro C, Costa CM, Correia DM, Nunes-Pereira J, Oliveira J, Martins P, et al. Electroactive poly(vinylidene fluoride)-based structures for advanced applications. *Nature protocols*. 2018;13(4):681.
84. Ribeiro C, Costa CM, Correia DM, Nunes-Pereira J, Oliveira J, Martins P, et al. Electroactive poly(vinylidene fluoride)-based structures for advanced applications. *Nature Protocols*. 2018;13(4):681-704.
85. Areias A, Ribeiro C, Sencadas V, García-Giralt N, Diez-Perez A, Ribelles JG, et al. Influence of crystallinity and fiber orientation on hydrophobicity and biological response of poly(L-lactide) electrospun mats. *Soft Matter*. 2012;8(21):5818-25.
86. Ferreira CG, Cardoso VF, Lopes AC, Botelho G, Lanceros-Méndez S. Tailoring microstructure and physical properties of poly(vinylidene fluoride-hexafluoropropylene) porous films. *Journal of Materials Science*. 2015;50(14):5047-58.
87. Cardoso VF, Lopes AC, Botelho G, Lanceros-Méndez S. Poly(vinylidene fluoride-trifluoroethylene) porous films: Tailoring microstructure and physical properties by solvent casting strategies. *Soft Materials*. 2015;13(4):243-53.

88. Ferreira BMP, Pinheiro LMP, Nascente PAP, Ferreira MJ, Duek EAR. Plasma surface treatments of poly(l-lactic acid) (PLLA) and poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBV). *Materials Science and Engineering: C*. 2009;29(3):806-13.
89. Correia DM, Ribeiro C, Botelho G, Borges J, Lopes C, Vaz F, et al. Superhydrophilic poly(l-lactic acid) electrospun membranes for biomedical applications obtained by argon and oxygen plasma treatment. *Applied Surface Science*. 2016;371:74-82.
90. Mattioli S, Kenny J, Armentano I. Plasma surface modification of porous PLLA films: analysis of surface properties and in vitro hydrolytic degradation. *Journal of Applied Polymer Science*. 2012;125(S2):E239-E47.
91. Zhou W, Wang ZL. *Scanning microscopy for nanotechnology: techniques and applications*: Springer science & business media; 2007.
92. Goldstein JI, Newbury DE, Echlin P, Joy DC, Lyman CE, Lifshin E, et al. *The SEM and Its Modes of Operation. Scanning Electron Microscopy and X-Ray microanalysis*: Springer; 2003. p. 21-60.
93. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. *Principles of instrumental analysis*: Cengage learning; 2017.
94. Taylor M, Urquhart AJ, Zelzer M, Davies MC, Alexander MR. Picoliter Water Contact Angle Measurement on Polymers. *Langmuir*. 2007;23(13):6875-8.
95. Yuan Y, Lee TR. Contact Angle and Wetting Properties. In: Bracco G, Holst B, editors. *Surface Science Techniques*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013. p. 3-34.
96. Gundersen H, Leinaas HP, Thaulow C. Surface Structure and Wetting Characteristics of Collembola Cuticles. *PLOS ONE*. 2014;9(2):e86783.
97. Gauglitz G, Moore DS. *Handbook of spectroscopy*: John Wiley & Sons; 2014.
98. Schawe JEK, Bergmann E. Investigation of polymer melting by temperature modulated differential scanning calorimetry and it's description using kinetic models. *Thermochimica Acta*. 1997;304-305:179-86.
99. Gabbott P. *Principles and applications of thermal analysis*: John Wiley & Sons; 2008.
100. Correia DM, Sencadas V, Ribeiro C, Martins PM, Martins P, Gama FM, et al. Processing and size range separation of pristine and magnetic poly(l-lactic acid) based microspheres for biomedical applications. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2016;476:79-86.
101. Ueland M, Blanes L, Taudte RV, Stuart BH, Cole N, Willis P, et al. Capillary-driven microfluidic paper-based analytical devices for lab on a chip screening of explosive residues in soil. *Journal of Chromatography A*. 2016;1436:28-33.
102. Shangguan J-W, Liu Y, Wang S, Hou Y-X, Xu B-Y, Xu J-J, et al. Paper Capillary Enables Effective Sampling for Microfluidic Paper Analytical Devices. *ACS sensors*. 2018.
103. Ko YC, Ratner BD, Hoffman AS. Characterization of hydrophilic—hydrophobic polymeric surfaces by contact angle measurements. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1981;82(1):25-37.
104. Mert O, Doganci E, Erbil H, Demir A. Surface characterization of poly (l-lactic acid)– methoxy poly (ethylene glycol) diblock copolymers by static and dynamic contact angle measurements, FTIR, and ATR-FTIR. *Langmuir*. 2008;24(3):749-57.
105. Krikorian V, Pochan DJ. Crystallization behavior of poly (L-lactic acid) nanocomposites: nucleation and growth probed by infrared spectroscopy. *Macromolecules*. 2005;38(15):6520-7.

106. Garlotta D. A literature review of poly (lactic acid). *Journal of Polymers and the Environment*. 2001;9(2):63-84.
107. Tian F, Niu X, Li X, Feng Q, Fan Y. Porous poly (L-lactic acid) scaffold reinforced by titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*. 2016;6(6):478-83.
108. Correia DM, Sencadas V, Ribeiro C, Martins P, Martins P, Gama F, et al. Processing and size range separation of pristine and magnetic poly (L-lactic acid) based microspheres for biomedical applications. *Journal of colloid and interface science*. 2016;476:79-86.
109. Ribeiro C, Sencadas V, Costa CM, Ribelles JLG, Lanceros-Méndez S. Tailoring the morphology and crystallinity of poly (L-lactide acid) electrospun membranes. *Science and technology of advanced materials*. 2011;12(1):015001.
110. Yuan X, Mak AF, Kwok K, Yung BK, Yao K. Characterization of poly (L-lactic acid) fibers produced by melt spinning. *Journal of Applied Polymer Science*. 2001;81(1):251-60.
111. Martin O, Avérous L. Poly(lactic acid): plasticization and properties of biodegradable multiphase systems. *Polymer*. 2001;42(14):6209-19.
112. Correia DM, Ribeiro C, Sencadas V, Botelho G, Carabineiro S, Ribelles JG, et al. Influence of oxygen plasma treatment parameters on poly (vinylidene fluoride) electrospun fiber mats wettability. *Progress in Organic Coatings*. 2015;85:151-8.
113. Zandén C, Erkenstam NH, Padel T, Wittgenstein J, Liu J, Kuhn HG. Stem cell responses to plasma surface modified electrospun polyurethane scaffolds. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2014;10(5):e949-e58.
114. Hamad K, Kaseem M, Yang H, Deri F, Ko Y. Properties and medical applications of polylactic acid: A review. *Express Polymer Letters*. 2015;9(5).
115. Cardoso VF, Botelho G, Lanceros-Méndez S. Nonsolvent induced phase separation preparation of poly (vinylidene fluoride-co-chlorotrifluoroethylene) membranes with tailored morphology, piezoelectric phase content and mechanical properties. *Materials & Design*. 2015;88:390-7.